

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

INSERM UMR_S1113 Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie

THÈSE présentée par :

Bénédicte CARON

soutenue le : **28 octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Physiopathologie du gène homéotique CDX2 dans le pancréas

THÈSE dirigée par :

Mme DULUC Isabelle
Mr REIMUND Jean-Marie

CRCN-HDR, INSERM UMR_S1113 – Université de Strasbourg
PUPH, INSERM UMR_S1113 – Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr BUSCAIL Louis
Mr IOVANNA Juan

PUPH, INSERM UMR 1037 - Université de Toulouse
DR, INSERM U1068 – Université de Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme CHENARD Marie-Pierre
Mme VAN SEUNINGEN Isabelle

PUPH, CNRS UMR 7104 - INSERM U1258 - Université de Strasbourg
DR1 CNRS, INSERM UMR-S1172 – Université de Lille

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

INSERM UMR_S1113 Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie

THÈSE présentée par :

Bénédicte CARON

soutenue le : **28 octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Physiopathologie du gène homéotique CDX2 dans le pancréas

THÈSE dirigée par :

Mme DULUC Isabelle
Mr REIMUND Jean-Marie

CRCN-HDR, INSERM UMR_S1113 – Université de Strasbourg
PUPH, INSERM UMR_S1113 – Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr BUSCAIL Louis
Mr IOVANNA Juan

PUPH, INSERM UMR 1037 - Université de Toulouse
DR, INSERM U1068 – Université de Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme CHENARD Marie-Pierre
Mme VAN SEUNINGEN Isabelle

PUPH, CNRS UMR 7104 - INSERM U1258 - Université de Strasbourg
DR1 CNRS, INSERM UMR-S1172 – Université de Lille

Ce travail a été financé par la Ligue Nationale Contre le Cancer

et la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie.

REMERCIEMENTS

A Madame Marie-Pierre Chenard, Madame Isabelle Van Seuningen, Monsieur Louis Buscail et Monsieur Juan Iovanna. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail.

A Madame Isabelle Duluc, ma directrice de thèse. Je te remercie pour ton soutien et ton encadrement, tes enseignements et conseils tout au long de cette thèse. Merci pour ta bienveillance et ta disponibilité. Merci d'avoir accepté toutes les contraintes liées à mon statut de doctorant médecin.

A Monsieur Jean-Marie Reimund, mon co-directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de la recherche. Merci de m'avoir accordé votre confiance pendant ces années d'internat et de clinicat. Les moments passés à vos côtés sont toujours riches d'enseignement. Je n'aurais pu mener à terme ce travail sans votre soutien.

A Monsieur Jean-Noël Freund, je te remercie de m'avoir accepté dans ton unité. Merci de la confiance que tu m'as témoignée en me confiant ce projet. Merci pour ton enthousiasme communicatif, tes conseils et toutes ces discussions scientifiques qui ont été très enrichissantes.

A Monsieur le Professeur Duclos et Monsieur le Professeur Serfaty, je vous remercie de m'avoir permis de mener conjointement ce travail de recherche et mon activité clinique et de votre soutien durant toutes ces années.

A Madame Gerlinde Avérous, merci pour votre patience, votre disponibilité et pour tout ce que vous avez pu me transmettre. Merci de m'avoir tant aidée dans la lecture des lames histologiques.

A tous les membres de l'équipe, Claire, Isabelle G, Elisabeth, Leonor, merci pour votre aide dans ce travail.

Aux doctorants du labo (actuels et passés), Jean-Baptiste, Susanna, Alex, Gilles, Anais, Camille, Ahlam et tous les autres.

A Marine, Emilie et Karima, pour toute l'aide que vous m'avez apportée, votre soutien, votre énergie et votre humour. Ce fut un plaisir de partager ce bureau avec vous pendant toutes

ces années. Une pensée particulière pour Marine sans qui je n'aurais jamais réussi à terminer ce manuscrit.

A mes collègues du service d'Hépatogastroentérologie de l'hôpital de Hautepierre, je vous remercie pour votre soutien tout au long de ce travail.

A mes parents, je vous remercie pour votre soutien sans faille, votre écoute et votre patience. Merci de toujours croire en moi.

A Sophie et Mathieu, à ma famille, qui m'ont toujours encouragée et soutenue, malgré les centaines de kilomètres qui nous séparent.

A mes proches disparus.

A Yves, je te remercie de m'avoir soutenue et supportée pendant cette thèse. Merci de m'encourager et d'avoir confiance en moi. Merci de comprendre, d'accepter mes absences et ce temps passé derrière l'ordinateur. Merci d'être présent à chaque instant, de m'aider à relativiser tous ces problèmes qui finalement n'en sont pas.

A Annélie et Julien, Marie, Hélène, Romain, Nicolas, Gregory, Sophie, Héloïse, Irene, Marion, Laura, merci pour tous ces moments d'amitié.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

1.	INTRODUCTION.....	2
1.1.	La physiologie pancréatique.....	3
1.1.1.	Structure du pancréas.....	3
1.1.2.	Pancréas exocrine.....	4
1.1.3.	Pancréas endocrine.....	5
1.1.4.	Embryologie du pancréas.....	6
1.2.	Les pathologies du pancréas exocrine.....	13
1.2.1.	Les tumeurs pancréatiques.....	13
1.2.2.	La pancréatite aigue.....	13
1.2.3.	La pancréatite chronique.....	14
1.3.	L'adénocarcinome pancréatique.....	15
1.3.1.	Epidémiologie.....	15
1.3.2.	Facteurs de risque de l'adénocarcinome pancréatique.....	17
1.3.3.	Anatomopathologie de l'adénocarcinome du pancréas.....	19
1.3.4.	Les lésions préneoplasiques.....	20
1.3.5.	Classification clinique des adénocarcinomes pancréatiques.....	26
1.3.6.	Altérations chromosomiques dans l'adénocarcinome pancréatique.....	27
1.3.7.	Prise en charge diagnostique.....	33
1.3.8.	Prise en charge thérapeutique.....	36
1.3.9.	Perspectives thérapeutiques.....	38
1.3.10.	Modèles précliniques d'étude de la cancérogenèse pancréatique.....	39
1.4.	Le gène homéotique <i>CDX2</i>	43
1.4.1.	Caractéristiques de <i>CDX2</i>	43
1.4.2.	Expression et fonctions physiologiques de <i>CDX2</i>	45
1.4.3.	<i>CDX2</i> dans les cancers colorectaux.....	47
1.4.4.	<i>CDX2</i> et résistance à la chimiothérapie.....	48
1.4.5.	Expression ectopique de <i>CDX2</i>	48

1.4.6. Mécanismes moléculaires de l'induction de l'expression de <i>CDX2</i>	51
2. OBJECTIFS DE LA THESE	55
3. RESULTATS	58
3.1. Résumé des résultats obtenus	58
3.1.1. Caractérisation de l'expression de <i>CDX2</i> dans le pancréas humain sain.....	58
3.1.2. Caractérisation de l'expression de <i>CDX2</i> dans l'adénocarcinome pancréatique	58
3.1.3. Conséquence de l'expression de <i>CDX2</i> dans l'adénocarcinome pancréatique sur la survie des patients.....	59
3.1.4. Caractérisation de l'expression de <i>CDX2</i> dans les TIPMP de type intestinal ...	60
3.1.5. Expression de <i>Cdx2</i> au sein du modèle murin d'étude de la cancérogenèse pancréatique <i>Pdx1-Cre::Kras^{G12D}</i>	60
3.1.6. Caractérisation des lésions pancréatiques résultant de l'expression ectopique de <i>CDX2</i> dans le pancréas du modèle <i>RsCDX2::AhCre^{ERT}</i>	60
3.1.7. Caractérisation des lésions pancréatiques résultant de l'expression ectopique de mini <i>CDX2</i> dans le pancréas du modèle <i>jojo-Flag-miniCDX2::VilCre</i>	63
3.1.8. Etude de l'évolution des lésions dans un fond génétique <i>Apc^{+Δ14}</i>	64
3.1.9. Etude de l'évolution des lésions dans le contexte pro-tumoral de l'activation oncogénique de <i>KRAS</i>	64
3.2. Résultats complémentaires	66
3.3. Publication	68
4. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE	100
4.1. <i>CDX2</i> : Profil d'expression et impact sur la survie dans l'adénocarcinome pancréatique chez l'homme	100
4.2. Conséquences physiopathologiques de l'expression ectopique de <i>CDX2</i> dans le pancréas grâce à un modèle murin.....	102
4.3. Conclusion générale	106

BIBLIOGRAPHIE

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADCP : Adénocarcinome Canalaire du Pancréas

ADM : Acinar-to-Ductal Metaplasia

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ah : Aryl hydrocarbon

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AKT : Ak transforming = PKB : Protein Kinase B

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ARN: Acide Ribonucléique

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

B

BMP: Bone Morphogenetic Protein

βNF: β-naphthoflavone

BRCA: BReast CAncer

C

C-MYC: cellular Myelocytomatosis

CA 19-9: Carbohydrate Antigen 19-9

CAR-T cells: T-cells called Chimeric Antigen Receptor

CCK: Cholécystokinine

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

CDU-HGE : Collégiale des Universitaires en Hépatogastro-Entérologie

CDX2: Caudal-Type Homeobox 2

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CK19: cytokeratin-19

Cre: Cyclization recombinase ou Causes recombination

CRT: Chimio-Radiothérapie

CYP1A1: Cytochrome P450 family 1 subfamily A

CYP26A: Cytochrome P450 family 26 subfamily A

D

DCLK1: Double Cortin-Like Kinase 1

E

ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2

ER^T: Estrogen Receptor T

F

FAMMM: Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

5FU: 5-fluorouracile

G

GATA: Glutamyl-tRNA aminotransferase

GHpA: polyadenylation site of the human Growth Hormone gene

GSX: Genomic Screened Homeobox

GTP: Guanosine Triphosphate

H

HD: Homeodomain

HES1: Hes family HLH transcription factor 1

HNF: Hepatocyte Nuclear Factor

HoxB7: Homeobox B7

I

IBA1: Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1

ICGC : International Cancer Genome Consortium

IHC : Immunohistochimie

INCA : Institut National du Cancer

IPMN : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

K

KLF4: Kruppel-Like Factor 4

KO: Knock-out

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma 2 viral oncogene homolog

KRT19: Cytokeratin 19

L

LBD: Ligand Binding Domain

LoxP: Locus of X-over P1

LSL: Lox-Stop-Lox

LYZ2: Lysozyme 2

M

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCN: Mucinous Cystic Neoplasm

MET = HGFR: Hepatocyte Growth Factor Receptor

MIST1: Muscle, Intestine and Stomach expression 1

MLH1: MutL Homolog 1

MSH: MutS Homolog

MSI: Microsatellite Instability

MSI1: Musashi 1

MUC: Mucine

N

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B

NGN3: Neurogenin 3

NHEJ: Non-Homologous End Joining

NKX6.1: Nk6 homeobox 1

NLS: Nuclear Localization Signal

O

OLFM4: Olfactomedin 4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS: Overall Survival

P

PA: Pancréatite Aigüe

PALB2: Partner And Localizer of BRCA2

PanIN: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia

PARP: Poly(ADP-ribose) Polymérase

PC : Pancréatite Chronique

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

PDAC: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

PDX: Pancreatic and Duodenal Homeobox

PH3: Phospho Histone 3

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PP: Pancreatic Polypeptide

PRSS1: Protease serine 1

PTF1A: Pancreas Associated Transcription Factor 1a

R

RAS: Rat Sarcoma

RFS: Recurrence Free Survival

RT: Reverse Transcription

S

SD: Stabilization Domain

SG: Survie Globale

shARN: short hairpin ARN

SHH: Sonic Hedgehog

α SMA: alpha-Smooth Muscle Actin

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4

SMV/PV: Superior Mesenteric Vein / Portal Vein

SOX: Sry-related HMG box

SPINK1: Serine Peptidase Inhibitor Kazal type 1

SR protein: Serine-arginine-Rich splicing factors

SSP : Survie Sans Progression

SSR : Survie Sans Récidive

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STK11: Serine/Threonine Kinase 11

T

TAD: TransActivator Domain

TAM : Tamoxifène

TAP63: Transactivation domain-containing P63

TAZ: Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif

TEP-FDG : Tomodensitométrie par Emission de Positrons au ^{18}F -fluorodésoxyglucose

TGF β : Transforming Growth Factor β

TIPMP : Tumeurs Intra-canaliaires Papillaires Mucineuses du Pancréas

TNM: Tumor Node Metastasis

TP53: Tumor Protein 53

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W

Wnt: Wingless-type MMPTV integration site family member

X

XRE : Xenobiotic Response Element

Y

YAP : Yes-Associated Protein

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure du pancréas.....	3
Figure 2 : Système canalaire du pancréas.....	4
Figure 3 : Histologie du pancréas.....	5
Figure 4 : Formation des bourgeons pancréatiques.....	8
Figure 5 : Différenciation des lignées pancréatiques exocrine et endocrine chez la souris....	10
Figure 6 : Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer dans les pays occidentaux..	16
Figure 7 : Classification des lésions précancéreuses dans le pancréas.....	20
Figure 8 : Coupe histologique de PanIN de bas grade.....	21
Figure 9 : Coupe histologique de PanIN de haut grade.....	21
Figure 10 : Coupe histologique de cystadénome mucineux.....	22
Figure 11 : Coupe histologique de métaplasie acino-canalaire.....	23
Figure 12 : Coupe histologique de TIPMP de type intestinal.....	25
Figure 13 : Etude de stratification des adénocarcinomes pancréatiques.....	30
Figure 14 : Courbes de survie selon le sous-type d'adénocarcinome pancréatique.....	30
Figure 15 : Courbes de survie selon le sous-type d'adénocarcinome pancréatique.....	31
Figure 16 : Représentation schématique de l'expression conditionnelle de la mutation $Kras^{G12D}$ dans un modèle murin.....	40
Figure 17 : Représentation schématique de la protéine CDX2 humaine.....	44
Figure 18 : Représentation schématique de la protéine humaine miniCDX2.....	45
Figure 19 : Courbes de survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans le cancer du côlon.....	47
Figure 20 : Expression de CDX2 dans différents types d'adénocarcinomes.....	50
Figure 21 : Construction génétique des souris RosaCdx2.....	62
Figure 22 : Courbes de survie globale et survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique.....	66
Figure 23 : Courbes de survie globale et survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique.....	67

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

L'adénocarcinome pancréatique est une maladie au pronostic sombre puisque la survie à 5 ans n'excède pas les 7 % (INCA 2015). Ceci est dû au fait que malgré l'amélioration des outils diagnostiques (imagerie par résonnance magnétique, échographie, endoscopie), seulement 15 à 20 % des patients ont une tumeur résécable au diagnostic. L'amélioration de la prise en charge de ce cancer, tant diagnostique que thérapeutique, représente donc un enjeu majeur.

1.1. La physiologie pancréatique

1.1.1. Structure du pancréas

Le pancréas est un organe du système digestif situé dans l'abdomen, en arrière de l'estomac. Il comporte quatre portions : la tête enchâssée dans le cadre duodénal, l'isthme (ou incisure ou col) pancréatique, le corps et la queue du pancréas (Figure 1) (CDU-HGE 2014).

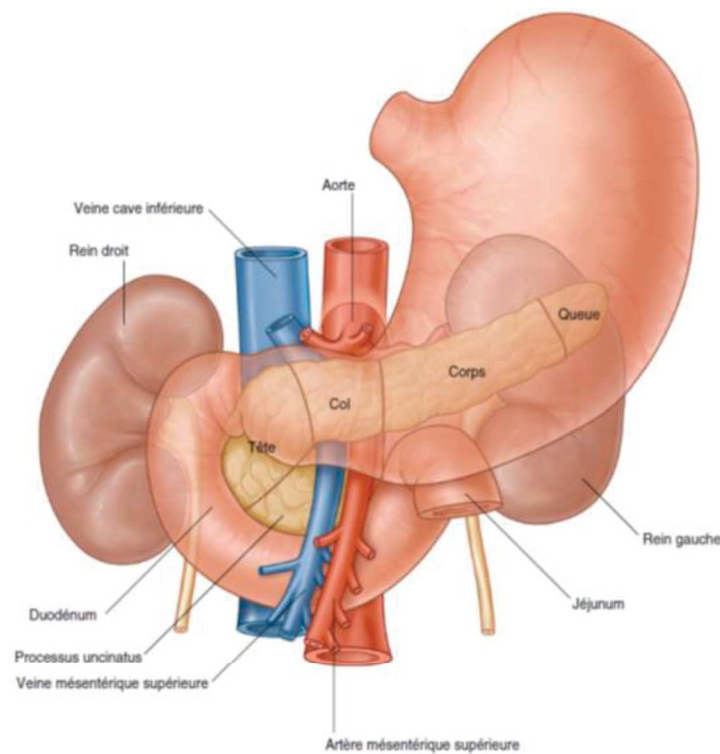


Figure 1: Structure du pancréas. (CDU-HGE 2014)

Histologiquement et fonctionnellement, le pancréas comprend deux parties : le pancréas exocrine associé à un réseau de canaux excréteurs qui se réunissent en deux canaux, le canal pancréatique principal ou canal de Wirsung et le canal pancréatique accessoire ou canal de Santorini, et le pancréas endocrine (Figure 2) (CDU-HGE 2014).

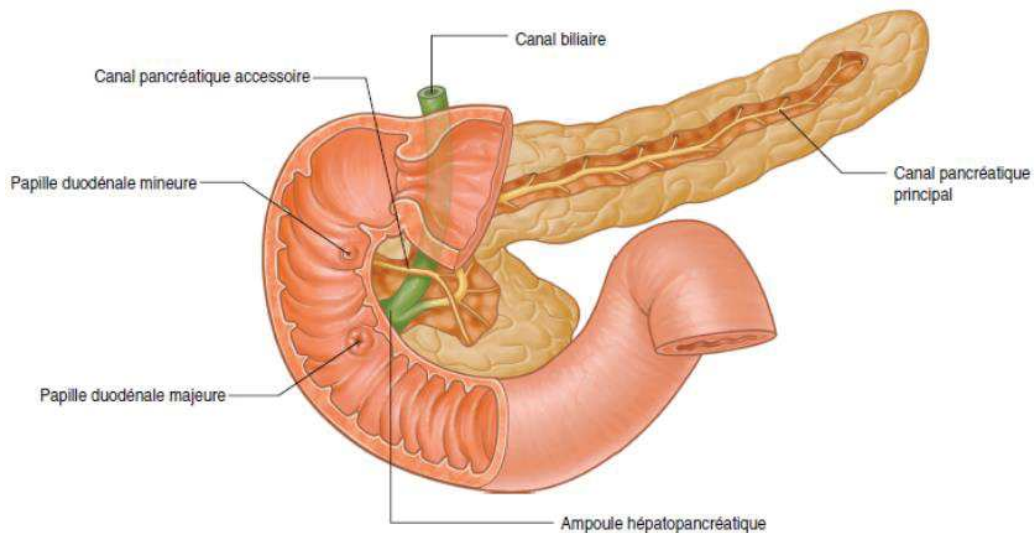


Figure 2: Système canalaire du pancréas. (CDU-HGE 2014)

1.1.2. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est organisé en lobules composés d'acini qui constituent 85 % de la masse pancréatique et dont les cellules épithéliales synthétisent les enzymes pancréatiques (Figure 3). Les acini sont composés de cellules sécrétoires de forme pyramidale regroupées en amas, parmi lesquelles les cellules acineuses, centro-acineuses et canalaire. Les cellules acineuses produisent et sécrètent des enzymes nécessaires à la digestion. Ces enzymes sont stockées au sein des grains de zymogène, situés au pôle apical des cellules acineuses. Les enzymes pancréatiques sont protéolytiques (ex : trypsine, élastase), amylolytiques (ex : α -amylase), lipolytiques (ex : lipase) ou nucléasiques (ex : DNase, RNase) (Whitcomb et al. 2007).

La sécrétion exocrine est drainée par les canaux intralobulaires qui centrent chaque acinus, puis interlobulaires et enfin collecteurs jusqu'à la papille duodénale permettant l'excrétion des enzymes pancréatiques dans le tube digestif, au niveau du duodénum. Les canaux sont bordés d'un épithélium simple (pavimenteux au départ des acini puis cubique et prismatique) puis bi et pluristratifié entouré d'une couche conjonctive d'épaisseur

progressivement croissante. Les cellules épithéliales formant la paroi de ces canaux élaborent et déversent dans leur lumière une sécrétion aqueuse, riche en bicarbonates et dépourvue d'enzymes, qui contribue, avec la sécrétion enzymatique des acini, à former le « suc pancréatique » finalement déversé dans le duodénum.

1.1.3. Pancréas endocrine

Le pancréas endocrine est formé par des amas de cellules endocrines, les îlots de Langerhans, qui représentent 1 à 2 % de la masse pancréatique (Figure 3). Ils sont disséminés dans le parenchyme exocrine, entre les acini. Ces structures sont vascularisées et innervées, elles permettent le contrôle de la sécrétion et le passage des hormones dans la circulation sanguine. Les îlots de Langerhans sont composés de cellules glandulaires qui produisent des hormones essentielles à la régulation de la glycémie au sein de l'organisme. Les cellules β représentent 75 % de ces cellules glandulaires et produisent l'insuline. Les cellules α (20 %) produisent le glucagon. Les cellules δ , ϵ et PP synthétisent respectivement la somatostatine, la gréline et le polypeptide pancréatique.

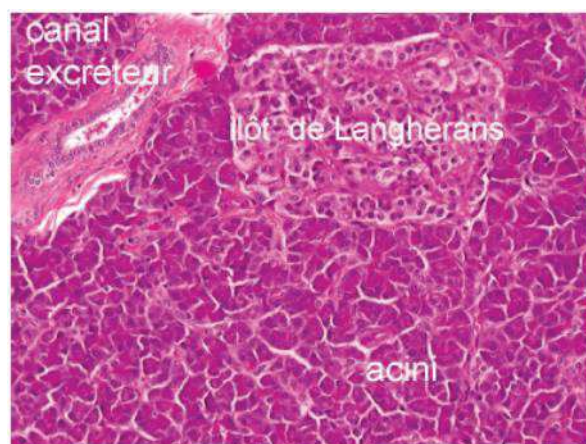


Figure 3: Histologie du pancréas.

Au sein du pancréas, on observe des acini, un canal excréteur et un îlot de Langerhans. (CDU-HGE 2014)

1.1.4. Embryologie du pancréas

1.1.4.1. Formation des bourgeons pancréatiques

Les cellules épithéliales pancréatiques dérivent de l'endoderme digestif. Chez l'homme, l'organogénèse pancréatique débute dès la fin de la 4^{ème} semaine de développement à partir d'une prolifération endodermique apparaissant à la partie caudale de l'endoderme intestinal antérieur, dans un domaine qui exprime le gène homéotique *PDX1* (Figures 4a et 5a). Il s'agit du bourgeon pancréatique dorsal. *PDX1* est un facteur de transcription homéotique dont l'importance dans le développement pancréatique a été démontrée chez l'homme et chez la souris (Leonard et al. 1993; Miller et al. 1994). Chez la souris, l'expression du facteur sécrété Sonic hedgehog (SHH), exprimé dans la plupart des épithélia digestifs, est spécifiquement réprimée au niveau de ce territoire ce qui permet l'expression de *PDX1* dans les cellules progénitrices pancréatiques (Apelqvist et al. 1997; Jonsson et al. 1994; Offield et al. 1996). La présence de la notochorde (sécrétion de Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) et Activin β 2) et de l'aorte dorsale (sécrétion de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) sont indispensables à l'inhibition de la voie SHH et à l'activation transcriptionnelle de *PDX1* (Pan et Wright 2011). Une deuxième évagination va apparaître en situation ventrale et plus caudale, en dessous de la vésicule biliaire, dans l'angle formé entre le canal cholédoque et le duodénum. Il s'agit du bourgeon pancréatique ventral. L'ébauche ventrale doit aussi sa morphogénèse à l'inhibition de la voie Hedgehog (Deutsch et al. 2001).

Les bourgeons pancréatiques dorsaux et ventraux sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9* et *Hnf1 β* (De Vas et al. 2015; Kawaguchi et al. 2002; Seymour et al. 2007). En l'absence de l'un de ces facteurs de transcription, la formation des bourgeons pancréatiques a lieu mais des défauts sévères de la croissance cellulaire et des processus de différenciation consécutifs sont observés. Les facteurs de transcription des progéniteurs pancréatiques sont bien identifiés mais les mécanismes permettant leur expression

et leur maintien sont moins caractérisés. Il a été décrit que l'expression de ces facteurs de transcription est régulée en partie via la voie Notch et par le mésenchyme environnant grâce aux facteurs Fibroblast Growth Factor (Jacquemin et al. 2006; Shih et al. 2012). Le Fgf10 est exprimé par le mésenchyme adjacent aux bourgeons pancréatiques. Il est essentiel à la prolifération des cellules progénitrices pancréatiques lors de la formation des bourgeons (Bhushan et al. 2001). Il a également été décrit que les cellules épithéliales progénitrices du pancréas expriment le Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2). Ces données suggèrent une signalisation directe du mésenchyme sur l'épithélium des bourgeons pancréatiques pour permettre la croissance des bourgeons et la spécification de la lignée pancréatique (Bhushan et al. 2001; Dichmann et al. 2003). Ceci a été précisé par les travaux de Seymour et al., qui démontrent que le Fgf10 sécrété par le mésenchyme permet le maintien de l'identité pancréatique des progéniteurs exprimant Fgfr2, via l'activation du facteur de transcription Sox9 (Seymour et al. 2012). De plus, Sox9 et Hnf1 β ont tous les deux des sites de fixation sur le promoteur de *Ptfla*, et la délétion de *Hnf1 β* dans le pancréas empêche l'expression de *Ptfla* et *Pdx1* (Pan et Wright 2011; Poll et al. 2006; Solar et al. 2009). *SOX9* et *HNF1 β* apparaissent donc comme étant des acteurs majeurs permettant la mise en place des progéniteurs pancréatiques.

Au cours de la 5^{ème} semaine de développement, des mouvements de rotation vont amener le bourgeon ventral 180° en arrière du duodénum, au contact et en dessous du bourgeon dorsal (Figures 4b et 4c). La fusion de ces deux bourgeons va constituer la glande pancréatique définitive. L'ébauche dorsale donnera la partie principale de la glande pancréatique (tête, corps et queue) et l'ébauche ventrale, l'uncus pancréatique (isthme). Cette fusion des deux ébauches aboutit également à la réunion des voies excrétrices du pancréas dorsal (canal de Santorini) et du pancréas ventral (canal de Wirsung), qui se jettent dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vater (Figure 4d). Dans 10 % des cas, le canal excréteur du bourgeon dorsal persiste et donne

le conduit pancréatique accessoire qui s'abouche dans le duodénum au niveau de la papille duodénale mineure, qui est située en amont de la papille principale.

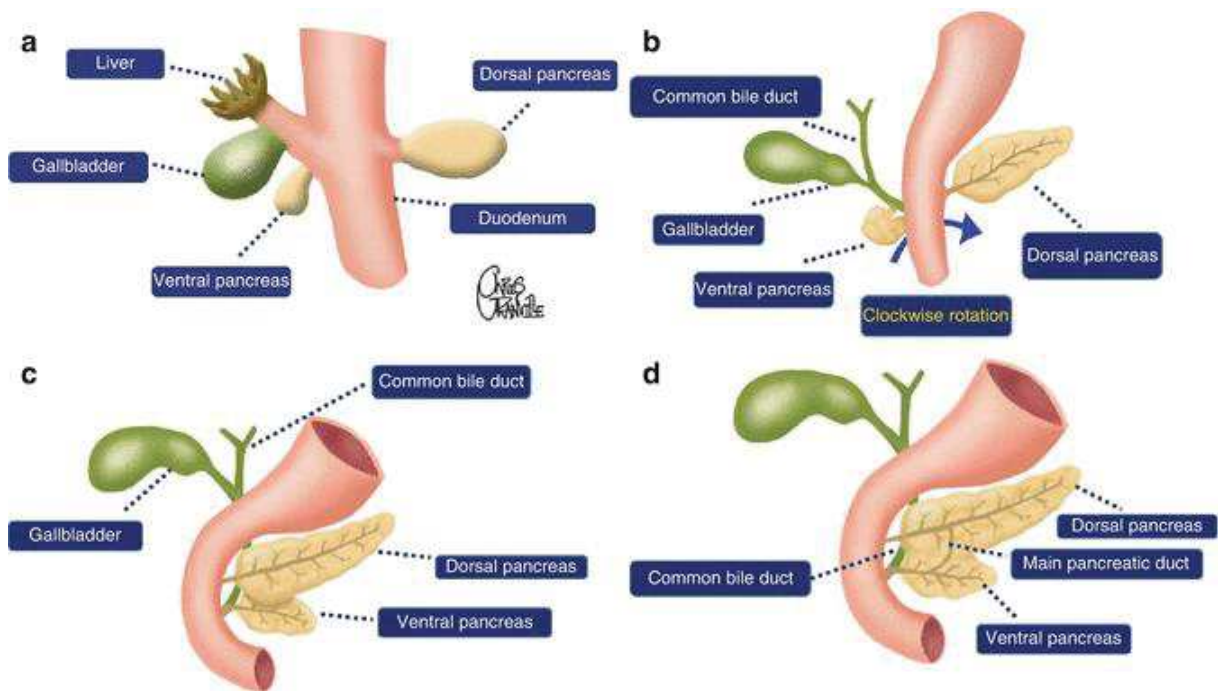


Figure 4: Formation des bourgeons pancréatiques.

a) Proliférations endodermiques à l'origine des bourgeons pancréatiques ventral et dorsal. b) Mouvements de rotation amenant le bourgeon ventral 180° en arrière du duodénum. c) Bourgeon ventral au contact et en-dessous du bourgeon dorsal. d) Fusion des 2 bourgeons et des voies excrétrices qui se jettent dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vater. (Casillas et al. 2016)

De la 6^{ème} à la 9^{ème} semaine de développement, il est décrit une prolifération épithéliale au sein du mésenchyme pancréatique avec augmentation du pool des progéniteurs pancréatiques. Ces cellules progénitrices vont s'organiser en structures pseudo canalaire qui vont ensuite se différencier en lignée exocrine et lignée endocrine. Les cellules endocrines et exocrines dérivent toutes de l'endoderme et sont enveloppées de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins, tous deux d'origine mésodermique, et de cellules nerveuses et gliales provenant des cellules de la crête neurale.

1.1.4.2. Différenciation des cellules exocrines et endocrines

La différenciation des différents types cellulaires débute avant même la formation des bourgeons. Des travaux réalisés chez la souris ont mis en évidence que l'ensemble des types cellulaires constituant le pancréas sont issus de progéniteurs communs exprimant le facteur de transcription Pdx1. Il est décrit une ségrégation des progéniteurs en deux sous-types : les progéniteurs du tronc (« trunk progenitors ») et de l'apex (« tip progenitors ») (Figure 5b). Les progéniteurs du tronc sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription Nkx6.1 (Nk6 homeobox 1), Hes1 (Hes family HLH transcription factor 1), Sox9, Hnf1 β et permettent de générer les lignées endocrines et canalaire. Les progéniteurs de l'apex sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription Ptf1a et c-myc, et sont à l'origine de la différenciation de la lignée acineuse (Shih et al. 2013; Zhou et al. 2007).

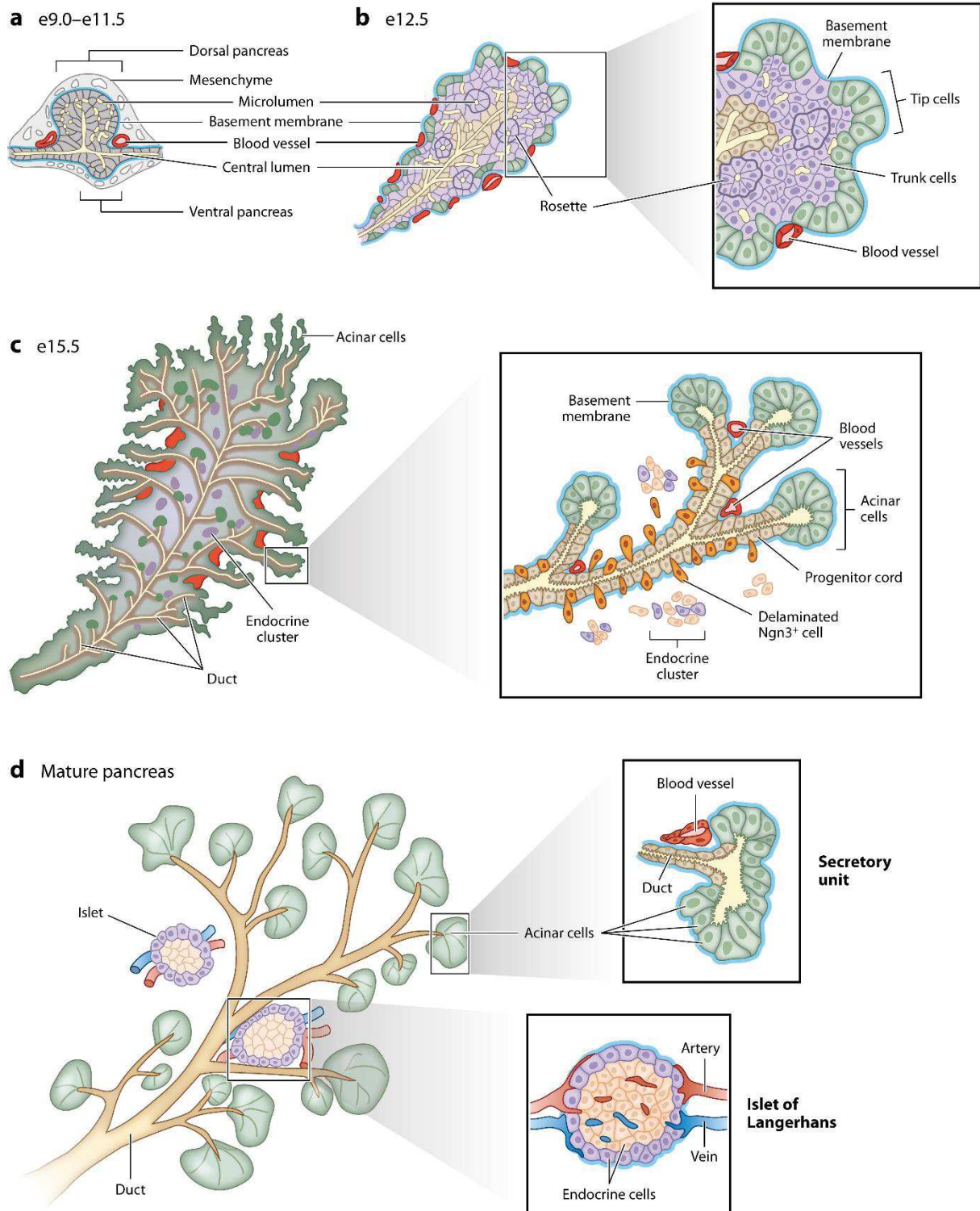


Figure 5: Différenciation des lignées pancréatiques exocrine et endocrine chez la souris.
a) Développement des bourgeons pancréatiques dorsal et ventral à partir de proliférations endodermiques. b) Ségrégation des progéniteurs communs en 2 sous-types : progéniteurs du tronc (« trunk cells ») et progéniteurs de l’apex (« tip cells »). c) Organisation des progéniteurs du tronc en tubules hiérarchisés appelés canaux primitifs, constituant l’épithélium qui génère les cellules endocrines. Différenciation des progéniteurs de l’apex vers un phénotype acineux. d) Pancréas matures composés d’ilots de Langerhans, de cellules canaliculaires, acineuses et centro acineuses. (Shih et al. 2013)

La lignée exocrine

A l'issue de la ségrégation entre les deux types de progéniteurs, les progéniteurs du tronc sont engagés dans un programme de différenciation leur permettant de générer les lignées canalaire et endocrines. Une première étape de morphogénèse permet aux progéniteurs du tronc de s'organiser en tubules hiérarchisés au sein de l'organe bourgeonnant, appelés canaux primitifs (Hick et al. 2009; Kesavan et al. 2009; Villasenor et al. 2010). Ces canaux primitifs constituent l'épithélium qui génère l'ensemble des cellules endocrines, en plus des cellules canalaire (Figure 5c) (Hick et al. 2009; Kopp et al. 2011). La majorité des facteurs de transcription exprimés dans les progéniteurs du tronc, tels que SOX9, HES1, HNF1 β sont conservés au sein des cellules canalaire. Les cellules canalaire s'organisent en une multitude de petites lumières indépendantes qui fusionneront secondairement en se remodelant pour former l'arborescence finale à la lumière intra canalaire unique (Gottrand et Turck 2016). Ces cellules expriment SOX9 et HNF1 β .

L'acinus est constitué des cellules acineuses et des cellules centro acineuses. La majorité des « tip cells » vont subir une différenciation vers un phénotype acineux (Figure 5c). L'expression du facteur de transcription PTF1A/P48 est le premier signe de différenciation exocrine. La première hypothèse est que ces cellules pourraient correspondre à des cellules progénitrices au sein du pancréas. Les souris invalidées (KO) pour ce gène présentent une hypoplasie pancréatique présentant une absence complète de cellules exocrines. Ce facteur est déterminant dans la spécification et le maintien des progéniteurs pancréatiques et dans la différenciation du lignage exocrine (Thompson et al. 2012). La différenciation en cellules acineuses est dépendante des voies Notch et Wnt. L'expression prolongée de Notch semble altérer la différenciation acineuse par inhibition de PTF1A alors que le signal Wnt entraîne la prolifération des cellules acineuses (Gottrand et Turck 2016).

La lignée endocrine

Une sous-population de cellules des canaux primitifs acquière l'expression du facteur de transcription Ngn3 (Neurogenin 3), qui constitue l'élément initial primordial dans la différenciation de la lignée endocrine. Les précurseurs exprimant Ngn3 sont capables de générer l'ensemble du panel des cellules endocrines (Desgraz et Herrera 2009). Les progéniteurs endocrines migrent depuis les canaux primitifs pour coloniser le tissu stromal environnant où ils formeront les îlots de Langerhans (Gouzi et al. 2011; Miyatsuka et al. 2011). Le KO murin de *Ngn3* aboutit à des souris dont le pancréas ne contient ni îlots de Langerhans ni cellules endocrines (Gradwohl et al. 2000). Le processus de différenciation des différents types cellulaires endocrines se fait par l'activation de différentes combinaisons de facteurs de transcription. En effet, la régulation du gène *NGN3* semble faire intervenir des gènes tels que *HNF1β*, *HES1* et *SOX9* entre autres (Oliver-Krasinski et Stoffers 2008). A la fin de la période embryonnaire, *SOX9* et *HNF1β* sont sous exprimés avant qu'une surexpression transitoire de *NGN3* permette la différenciation des cellules endocrines (Gottrand et Turck 2016).

1.2. Les pathologies du pancréas exocrine

Les principales atteintes du pancréas exocrines sont dominées par les lésions tumorales, la pancréatite aiguë et la pancréatite chronique.

1.2.1. Les tumeurs pancréatiques

La vaste majorité des cancers du pancréas sont des adénocarcinomes canaux pancréatiques, se développant à partir des canaux excréteurs. D'autres types de tumeurs rares représentant 10 % des cancers du pancréas peuvent se développer sur le pancréas : les tumeurs neuroendocrines, le cystadénocarcinome, l'adénocarcinome polymorphe, le carcinome adénoquameux, le carcinome à cellules acineuses, le micro-adénocarcinome, le pancréatoblastome, l'oncocytome malin et la tumeur acineuse.

1.2.2 La pancréatite aiguë

La pancréatite aiguë (PA) correspond à une inflammation aiguë de la glande pancréatique. Le diagnostic de PA repose sur l'association d'au moins deux des trois critères : une élévation de la lipasémie supérieure à 3 fois la norme supérieure, des douleurs abdominales pancréatiques typiques et des caractéristiques de PA à l'imagerie (Banks et al. 2013). On distingue deux formes anatomopathologiques: la pancréatite œdémateuse et la pancréatite nécrosante (5 à 10 %). La PA est induite par un facteur déclenchant (principalement alcool et lithiase biliaire) responsable d'une activation non régulée de trypsinogène en trypsine au sein des cellules acineuses (Frossard et al. 2008; Hashimoto et al. 2008). Cela entraîne une auto-digestion de la glande pancréatique associée à une inflammation locale (Frossard et al. 2008; Pandol et al. 2007).

1.2.3. La pancréatite chronique

La pancréatite chronique (PC) est une maladie inflammatoire chronique et fibrosante du pancréas, pouvant conduire à la destruction irréversible du parenchyme exocrine et du parenchyme endocrine (Beyer et al. 2020). L'intoxication éthylique en est la cause la plus fréquente. La fibrose et les calcifications intra-parenchymateuses ou intra-canalaires traduisent l'inflammation de la glande et peuvent comprimer le canal de Wirsung ou le canal cholédoque. L'intoxication alcoolique chronique entraîne des anomalies de la sécrétion des protéines pancréatiques ainsi qu'une diminution de la synthèse de la lithostatine expliquant la formation des calculs intra-parenchymateux et intra-canalaires. Les symptômes principaux de la PC sont l'altération de l'état général, les douleurs abdominales ainsi que les symptômes liés à l'insuffisance pancréatique exocrine et/ou endocrine.

1.3. L'adénocarcinome pancréatique

1.3.1. Epidémiologie

L'adénocarcinome canalaire du pancréas (ADCP) est la tumeur pancréatique la plus fréquente (Thésaurus national de Cancérologie Digestive 2018), représentant 90 % des tumeurs pancréatiques solides. La majorité de ces tumeurs se situent au niveau de la tête du pancréas. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'incidence du cancer du pancréas dans le monde était de 337 872 individus en 2012, représentant 2,4 % de l'ensemble des cancers recensés (Rahib et al. 2014). Le nombre de décès par cancer du pancréas était estimé à environ 330 000 patients, représentant 4 % des décès par cancer toutes localisations confondues. Il s'agissait de la 7^{ème} cause de décès par cancer dans le monde. Le cancer du pancréas se place au 4^{ème} rang de la mortalité par cancer en Europe (132 000 nouveaux cas et 128 000 décès en 2018) (Ferlay et al. 2018). En France, l'incidence de l'ADCP était estimée à 14 220 cas en 2017 (Institut National du Cancer 2019). Des projections récentes estiment que le cancer du pancréas sera la 2^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde en 2030 (Figure 6) (Rahib et al. 2014).

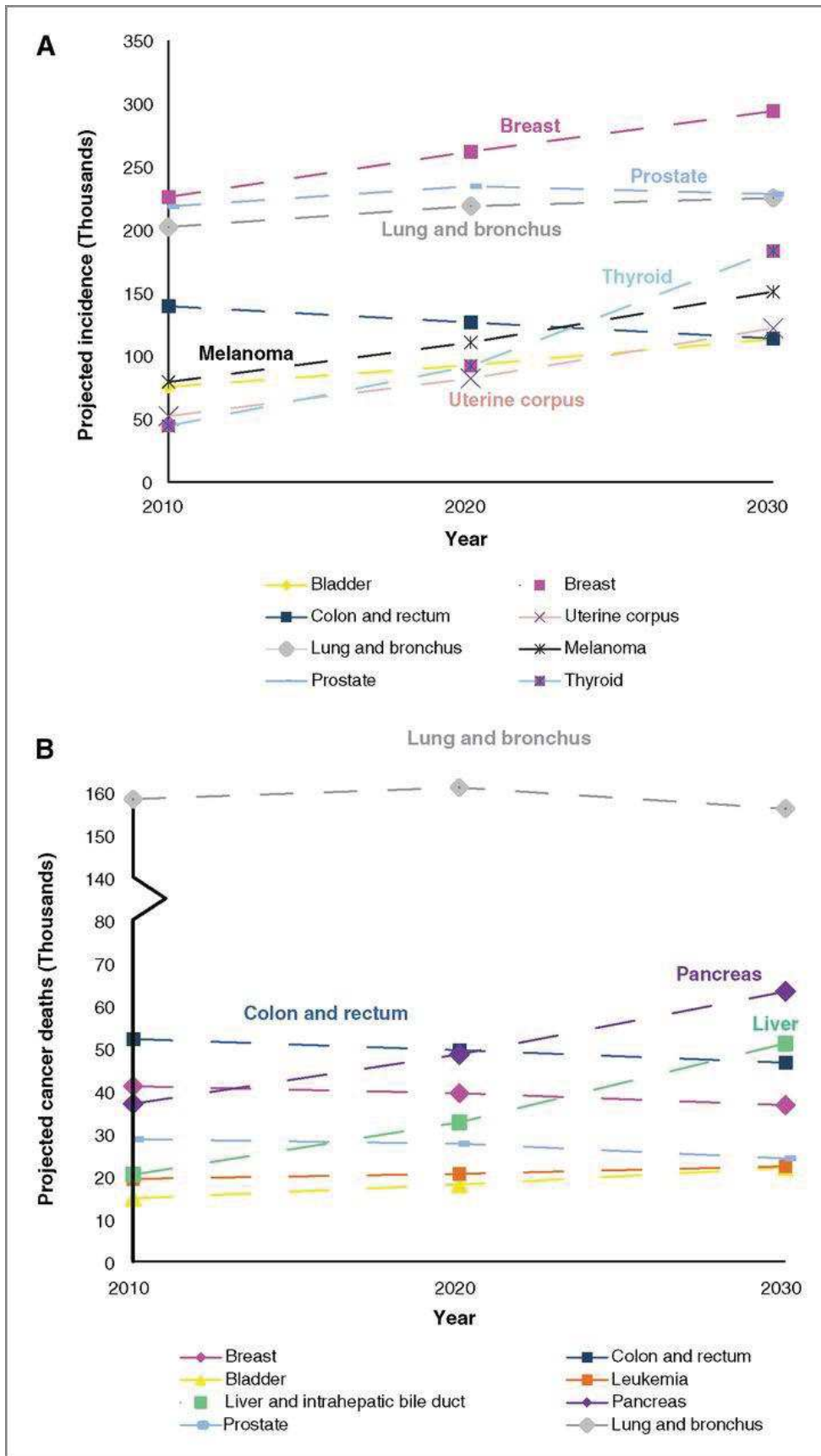


Figure 6: Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer dans les pays occidentaux. (Rahib et al. 2014)

Son pronostic reste très mauvais avec une survie globale (SG) à 5 ans égale à 7 % tous stades confondus (INCA 2015). Ce faible taux de survie peut être attribué à plusieurs facteurs, le plus important d'entre eux étant le retard diagnostique, car le diagnostic est malheureusement réalisé dans l'immense majorité des cas à un stade avancé, et que la maladie reste longtemps asymptomatique. En effet, au diagnostic, seulement 15 à 20 % des patients ont une tumeur résécable, la majorité des patients ayant une tumeur avancée, soit localement dans un tiers des cas, soit métastatique dans plus de la moitié des cas, hors des possibilités de résection chirurgicale à visée curatrice. De plus, différentes études génomiques, transcriptomiques, protéomiques ou métabolomiques ont montré une hétérogénéité inter-patients mais aussi intra-tumorale. Actuellement, les différents traitements proposés ne prennent pas en compte le caractère hétérogène de l'ADCP.

1.3.2. Facteurs de risque de l'adénocarcinome pancréatique

1.3.2.1. Facteurs de risque exogènes

Le seul facteur de risque exogène identifié à ce jour est le tabac, que ce soit par consommation active ou passive. Il est responsable d'une augmentation du risque d'adénocarcinome pancréatique de 75 %, avec persistance de ce risque 10 ans après le sevrage tabagique (Iodice et al. 2008).

1.3.2.2. Facteurs de risque endogènes

Les affections pancréatiques prédisposant à un risque endogène d'adénocarcinome du pancréas sont la pancréatite chronique (Raimondi et al. 2010), le diabète qui augmente le risque de 30 % (Bosetti et al. 2014) et l'obésité (Arslan et al. 2010).

1.3.2.3. Facteurs de risque génétiques

Seulement 10 % des adénocarcinomes pancréatiques sont d'origine génétique. Ils peuvent être séparés en deux groupes : l'agrégation familiale et les syndromes génétiques.

Le contexte d'agrégation familiale non syndromique correspond à un syndrome où au moins deux apparentés du 1^{er} degré sont atteints en dehors de syndrome héréditaire prédisposant aux tumeurs (Hruban et al. 2010). Des mutations des gènes *PALB2* et *BRCA2* ont été mises en évidence dans ces familles (Jones et al. 2009), mais également du gène *ATM* (Roberts et al. 2012). Le ratio d'incidence standardisé varie de 5 à 30 selon le nombre d'apparentés atteints (Thésaurus national de Cancérologie Digestive 2018).

Les principaux syndromes génétiques prédisposant au cancer pancréatique sont :

- Le syndrome des cancers familiaux du sein et de l'ovaire avec mutation du gène *BRCA2* (Couch et al. 2007), qui expose à un risque de cancer du pancréas 3,5 à 10 fois supérieur à la normale (Van Asperen et al. 2005).
- Le syndrome du mélanome multiple familial (FAMMM) avec mutation de *CDKN2A/P16* (Goldstein et al. 1995), où le risque de cancer pancréatique au cours de la vie est de 17 % (Vasen et al. 2000).
- Le syndrome de Peutz-Jeghers avec mutation de *STK11* (Giardiello et al. 1987), avec un risque d'adénocarcinome du pancréas qui est 132 fois supérieur à la population normale, ainsi évalué à 36 % (Hruban et al. 2010).
- La pancréatite héréditaire avec mutation des gènes *PRSSI* et *SPINK1* (Lowenfels et al. 1997), où le risque est 50 à 80 fois supérieur à la population normale (Hruban et al. 2010).

- La mutation du gène *CFTR* impliqué dans la mucoviscidose (McWilliams et al. 2010), qui est responsable d'une inflammation pancréatique et associée à un sur risque de tumeur du pancréas de l'ordre de 5,3.
- Le syndrome de Lynch avec altération des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (*MSH2*, *MLH1* et *MSH6*) (Kastrinos et al. 2009), qui expose à un risque de cancer du pancréas de 1,3 % à 50 ans et 3,7 % à 70 ans, avec un risque augmenté de 8,6 fois par rapport à la population générale (Rustgi 2014).
- Le syndrome de Li Fraumeni avec mutation du gène *TP53* (Ruijs et al. 2010), où le risque relatif d'adénocarcinome pancréatique est 7,3 fois supérieur à la normale.
- La polypose familiale liée au gène *APC*, associée à un risque de 4,5 (Giardiello et al. 1993).

1.3.3. Anatomopathologie de l'adénocarcinome du pancréas

L'adénocarcinome canalaire du pancréas résulte d'une transformation maligne des cellules de l'épithélium des canaux excréteurs du pancréas exocrine. Suite à une (ou plusieurs) agression(s) tissulaire(s) et/ou à des mutations de gènes oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs, l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire est altéré (Kamisawa et al. 2016). Toutefois, la séquence des événements conduisant à un adénocarcinome pancréatique n'est qu'incomplètement connue.

Plusieurs lésions précurseurs de l'adénocarcinome du pancréas ont été décrites : les lésions néoplasiques intra-épithéliales non invasives (PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasia), les cystadénomes mucineux (MCN : mucinous cystic neoplasm), la métaplasie acino-canalaire (ADM : Acinar-to-Ductal Metaplasia) et les tumeurs intra-canalaire papillaires mucineuses du pancréas (TIPMP) (Figure 7) (Basturk et al. 2015).

Former terminology (based on 2004 Classification ² and 2010 WHO)	Revised terminology (2015)
PanIN-1a	Low-grade PanIN
PanIN-1b	Low-grade PanIN
PanIN-2	Low-grade PanIN
PanIN-3 (<i>carcinoma in-situ</i>)	High-grade PanIN
IPMN with low-grade dysplasia	IPMN, low-grade
IPMN with intermediate-grade dysplasia	IPMN, low-grade
IPMN with high-grade dysplasia (<i>carcinoma in-situ</i>)	IPMN, high-grade
IPMN with an associated invasive carcinoma	IPMN with an associated invasive carcinoma/invasive carcinoma with an associated IPMN (the latter may be used if the invasive component is substantial)
MCN with low-grade dysplasia	MCN, low-grade
MCN with intermediate-grade dysplasia	MCN, low-grade
MCN with high-grade dysplasia (<i>carcinoma in-situ</i>)	MCN, high-grade
MCN with an associated invasive carcinoma	MCN with an associated invasive carcinoma/invasive carcinoma with an associated MCN (the latter may be used if the invasive component is substantial)

Figure 7: Classification des lésions précancéreuses dans le pancréas. (Basturk et al. 2015)

1.3.4. Les lésions préneoplasiques

1.3.4.1. Les PanIN

Les PanIN sont des lésions microscopiques non invasives de dysplasie des cellules épithéliales bordant les canaux excréteurs. Elles sont composées de cellules cylindriques contenant des quantités variables de mucus et présentent des atypies cytologiques et architecturales. Elles peuvent être classées en deux catégories, les PanIN de bas grade qui sont des lésions de dysplasie de bas grade avec des atypies cellulaires modérées (Figure 8) et les PanIN de haut grade, lésions de dysplasie de haut grade correspondant au « carcinome in situ » qui présentent des atypies marquées (Figure 9) (Basturk et al. 2015). La mutation activatrice de l'oncogène *KRAS* et la mutation du gène suppresseur de tumeur *p16INK4A* sont fréquentes dans les PanIN de bas grade. On retrouve également dans les PanIN de haut grade des mutations des gènes *TP53*, *BRCA2* et *SMAD4* (Ying et al. 2016).

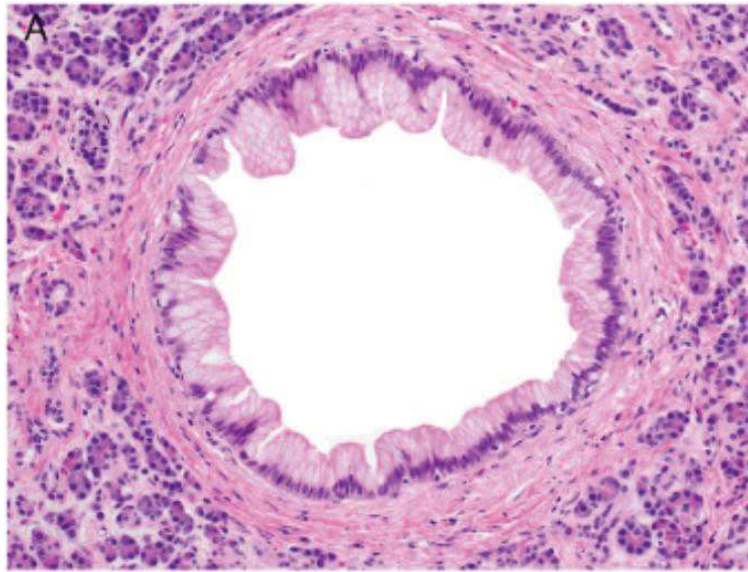


Figure 8: Coupe histologique de PanIN de bas grade.
Coloration Hématoxyline-éosine, x10. (Basturk et al. 2015)

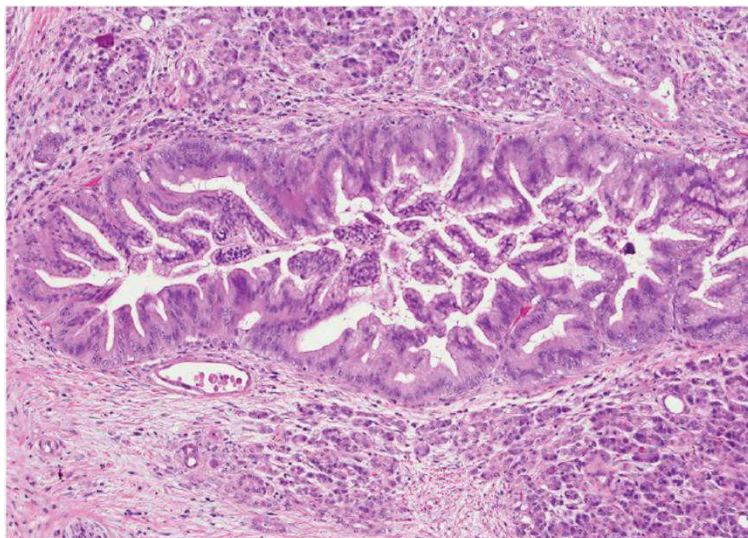


Figure 9: Coupe histologique de PanIN de haut grade.
Coloration Hématoxyline-éosine, x20. (Basturk et al. 2015)

1.3.4.2. Le cystadénome mucineux

Le cystadénome mucineux est une lésion kystique des acini ne communiquant que rarement avec le système canalaire. Il prédomine dans la région corporéo-caudale du pancréas.

Le kyste est tapissé par un épithélium mucosécrétant associé à un tissu fibreux, qui ressemble au tissu conjonctif de l'ovaire (« stroma ovarien ») (Figure 10). Microscopiquement, on peut visualiser des degrés différents de dysplasie, de bas grade jusque haut grade (Basturk et al. 2015). Son risque de dégénérescence est élevé et impose sa résection.

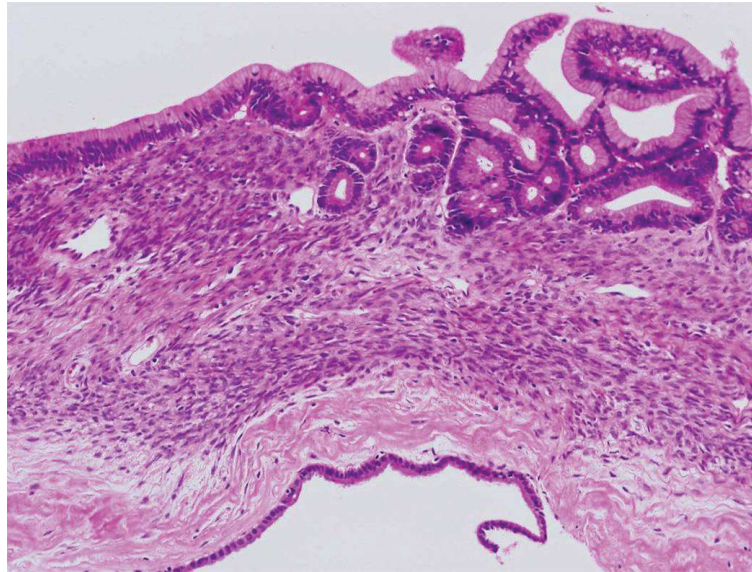


Figure 10 : Coupe histologique de cystadénome mucineux.
Coloration Hématoxyline-éosine (Barre d'échelle non précisée). (Hruban et Fukushima 2008)

1.3.4.3. La métaplasie acino-canalaire

La métaplasie acino-canalaire correspond à une transformation des acini en structures canalaire, associée à de la fibrose et de l'inflammation (Figure 11). Ce type de lésion se caractérise par une diminution de l'expression par la cellule acineuse de marqueurs de son identité (ex : amylase, *PTF1A*) et par une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques des canaux tels que *CK19*, *SOX9* et *KLF4* (Jensen et al. 2005; Wei et al. 2016). En effet, la cellule acineuse se transdifférencie et adopte une architecture proche de la cellule canalaire. L'une des origines de ces lésions serait attribuée à la grande plasticité des cellules acineuses (De Waele et al. 2014). La capacité de ces cellules à se transformer en cellules

possédant des caractéristiques canalaire surviendrait en particulier dans des conditions inflammatoires (cas des pancréatites chroniques ou aiguës) (Bhanot et Möller 2009; Kopp et al. 2012).

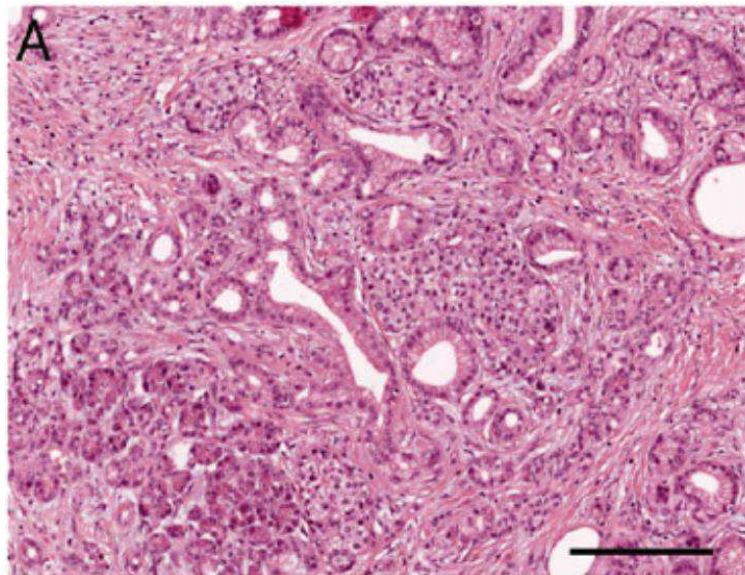


Figure 11: Coupe histologique de métaplasie acino-canalaire.
Coloration Hématoxyline-éosine, barre d'échelle : 200µm. (Basturk et al. 2015)

1.3.4.4. Les tumeurs intra-canalaire papillaires mucineuses du pancréas

La TIPMP est une tumeur généralement papillaire qui communique avec le système canalaire, visible macroscopiquement. Elle correspond à une prolifération anormale de l'épithélium d'un canal excréteur. Les TIPMP sont mucosécrétantes (Fernández-del Castillo et Adsay 2010) et la sécrétion de mucus est à l'origine d'une dilatation des canaux. Elles peuvent être localisées dans les canaux principaux et/ou secondaires. Le principal facteur de risque de dégénérescence en adénocarcinome pancréatique est l'atteinte du canal de Wirsung avec une dilatation supérieure à 10 mm. D'autres facteurs de risque élevé de dégénérescence ont été décrits tels que la présence d'une masse tissulaire parenchymateuse et la présence de nodule

mural intrakystique de plus de 5 mm et prenant le contraste. La séquence adénome-carcinome est bien établie avec tous les stades possibles depuis la dysplasie au carcinome invasif en passant par le carcinome *in situ* (Basturk et al. 2015). En l'absence de critères de dégénérescence, une surveillance doit être proposée. La chirurgie est indiquée en cas de présence d'au moins un facteur de risque élevé de dégénérescence.

Quatre sous-types histologiques de TIPMP ont été décrits (Furukawa et al. 2005; Katabi et Klimstra 2008), avec un risque de dysplasie différent. Ces sous-types sont : oncocytaire, gastrique, pancréato-biliaire et intestinal, par ordre de fréquence croissante.

- Le sous-type oncocytaire est rare et caractérisé par une prolifération de cellules à cytoplasme abondant et éosinophile. L'architecture est complexe avec une organisation en papilles épaisses et anastomosées. Les atypies cytonucléaires y sont fréquentes. Les cellules caractéristiques de ce sous-type expriment les mucines MUC1 et MUC6.
- Le sous-type gastrique se présente de manière identique à la muqueuse gastrique avec la prolifération de cellules ressemblant aux cellules épithéliales mucosécrétantes de la muqueuse gastrique. On peut y mettre en évidence l'expression des mucines MUC6 et MUC5AC. Le risque de transformation maligne est faible.
- Le sous-type pancréato-biliaire correspond à une prolifération de cellules ressemblant aux cellules épithéliales de revêtement des canaux biliaires et pancréatiques. Il est caractérisé par l'expression de la mucine MUC1. Le risque de transformation maligne est élevé.
- Le sous-type intestinal est le plus fréquent (Figure 12). Ce sous-type évolue le plus fréquemment vers un carcinome majoritairement de type colloïde, le risque de malignité est d'environ 35 %. Il correspond au développement d'une métaplasie intestinale et exprime des marqueurs intestinaux tels que la mucine MUC2 et le facteur de transcription CDX2 (Distler et al. 2014).

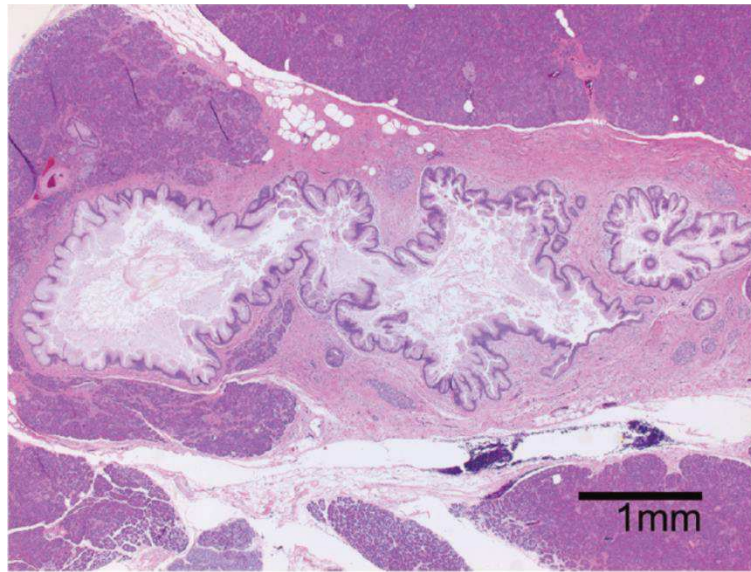


Figure 12: Coupe histologique de TIPMP de type intestinal.
Coloration Hématoxyline-éosine. (Basturk et al. 2015)

La métaplasie se définit comme étant la transformation d'un type cellulaire différencié en un autre type cellulaire différencié qui ne se forme pas normalement dans le tissu dans lequel il se trouve. Chez l'homme, elle se développe généralement dans un contexte où l'environnement cellulaire a été modifié. Ces modifications sont associées à une réponse inflammatoire ainsi qu'à un processus de régénération à l'origine de l'émergence de cellules métaplasiques, présentant un phénotype souvent mieux adapté pour résister au nouvel environnement.

La métaplasie intestinale correspond à une transformation partielle ou complète de l'épithélium normal d'un organe en un épithélium de type intestinal. Elle s'accompagne de l'expression ectopique du gène homéotique intestinal *CDX2*. Histologiquement, la métaplasie intestinale peut présenter les différents types de cellulaires intestinaux (entérocytes, cellules à mucus, cellules de Paneth et cellules entéroendocrines). Les cellules à mucus sont celles les plus fréquemment mises en évidence et utiles pour détecter la métaplasie intestinale

(Gutiérrez-González et Wright 2008). La métaplasie intestinale est une situation pathologique décrite dans divers organes tels que l'estomac, l'œsophage, les conduits et la vésicule biliaires, la muqueuse nasale, la vessie et le pancréas. Elle est généralement considérée comme une lésion précancéreuse sur la base de l'association observée entre les zones métaplasiques et des zones adénocarcinomateuses dans une proportion importante des cancers gastriques et œsophagiens (Mosnier 2012).

1.3.5. Classification clinique des adénocarcinomes pancréatiques

La classification TNM (Tumor Node Metastasis) permet de caractériser la tumeur en fonction de sa taille, de l'atteinte ganglionnaire et de la présence de localisations secondaires.

La classification TNM actuellement utilisée est celle de 2017 (8ème version), de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Brierley et al. 2017):

Tumeur (T) :

T1 : tumeur limitée au pancréas inférieure ou égale à 2 cm dans son plus grand diamètre

T1a : tumeur inférieure à 0,5 cm

T1b : tumeur supérieure à 0,5 cm et inférieure à 1 cm

T1c : tumeur supérieure à 1 cm et inférieure à 2 cm

T2 : tumeur limitée au pancréas supérieure à 2 cm et inférieure à 4 cm dans son plus grand diamètre

T3 : tumeur supérieure à 4 cm dans son plus grand diamètre

T4 : tumeur étendue au tronc cœliaque ou à l'artère mésentérique supérieure ou à l'artère hépatique commune.

Adénopathies (N) :

N0 : pas de métastase ganglionnaire régionale

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

N2 : envahissement d'au moins 4 ganglions lymphatiques régionaux

Métastases viscérales (M) :

M0 : pas de métastase

M1 : présence de métastase(s) à distance

Synthèse : les stades

Stade IA : T1, N0, M0

Stade IB : T2, N0, M0

Stade IIA : T3, N0, M0

Stade IIB : T1-3, N1, M0

Stade III : T1-3, N2, M0 ou T4, tout N, M0

Stade IV : M1 quel que soit T et N.

1.3.6. Altérations chromosomiques dans l'adénocarcinome pancréatique

Les adénocarcinomes pancréatiques étant des tumeurs hétérogènes, plusieurs classifications ont été proposées selon l'analyse des variants chromosomiques touchant des gènes connus pour être impliqués dans la carcinogenèse pancréatique tels que *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* mais aussi des cibles thérapeutiques comme *ERBB2*, *MET*, *FGFR1* (Waddell et al.

2015), ou encore selon les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la constitution du microenvironnement tumoral et de l'épithélium néoplasique (Moffitt et al. 2015).

Les quatre gènes majeurs mis en cause dans la cancérogenèse pancréatique sont l'oncogène *KRAS* et les gènes suppresseurs de tumeurs *CDKN2A*, *P53* et *SMAD4*. *KRAS* est muté dans 90 % des cas d'adénocarcinome du pancréas. Le gène suppresseur de tumeur le plus souvent mis en cause est *CDKN2A*, avec une perte de fonction dans plus de 90 % des adénocarcinomes pancréatiques. Des mutations de *TP53* sont également fréquentes, ainsi qu'une inactivation de *SMAD4* dans 50 % des tumeurs (Wood et Hruban 2012).

1.3.6.1. Etudes de stratification

En 2012, l'International Cancer Genome Consortium (ICGC) publie le séquençage d'une cohorte de 99 adénocarcinomes pancréatiques et identifie de nouvelles mutations dans les gènes des voies impliquées dans la modification de la chromatine, la réparation de l'ADN et le guidage axonal (Biankin et al. 2012). En dehors des mutations de *KRAS*, *P53*, *CDKN2A* et *SMAD4*, présentes dans plus de 50 % des cas, les autres mutations s'avèrent avoir une prévalence de moins de 2 %.

Une étude publiée en 2015 propose une classification des tumeurs pancréatiques en 4 sous-types (stable, localement réarrangé, disséminé et instable) basée sur le niveau de réarrangement chromosomique (Waddell et al. 2015). Les tumeurs stables (20 %) présentent moins de 50 réarrangements et une aneuploïdie récurrente, suggérant un défaut de cycle cellulaire/mitose. Le sous-type localement réarrangé (30 %) peut être divisé en 2 groupes. Environ un tiers des tumeurs présente des régions d'amplifications d'oncogènes connus (*KRAS*, *MET*, *ERBB2*). Les deux tiers restants comportent des réarrangements complexes tels que les cassures-fusions ou les chromothripsis. Le sous-type disséminé (36 %) inclut des tumeurs présentant moins de 200 réarrangements modérés. Les tumeurs du sous-type instable (14 %)

présentent un grand nombre de réarrangements (de 200 à 558), il existe une prédominance des mutations des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, tels que *BRCA1*, *BRCA2* et *PALB2*.

Moffitt et al. ont établi en 2015 une classification moléculaire tenant compte de la composante stromale des adénocarcinomes pancréatiques, grâce à un algorithme permettant de distinguer l'origine tissulaire des gènes (Moffitt et al. 2015). Quatre sous-types tumoraux ont été définis : tumeur classique, tumeur « basal-like », stroma normal et stroma activé. Il semble exister une meilleure survie globale pour les tumeurs avec stroma normal. Indépendamment des caractéristiques liées au stroma, les deux sous-types tumoraux principaux étaient le sous-type classique et le sous-type basal de plus mauvais pronostic.

En 2016, l'ICGC a publié une nouvelle étude de stratification des adénocarcinomes pancréatiques incluant le séquençage de 456 tumeurs (Bailey et al. 2016). Cette classification se base sur les réseaux transcriptionnels activés : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et ADEX (différenciation aberrante exocrine-endocrine) (Figure 13). Le sous-type squameux est associé au pronostic le plus sombre, avec mise en évidence des mutations *P53* et *TAP63* (Figure 14). Cette nouvelle classification pourra probablement permettre de nouveaux essais thérapeutiques.

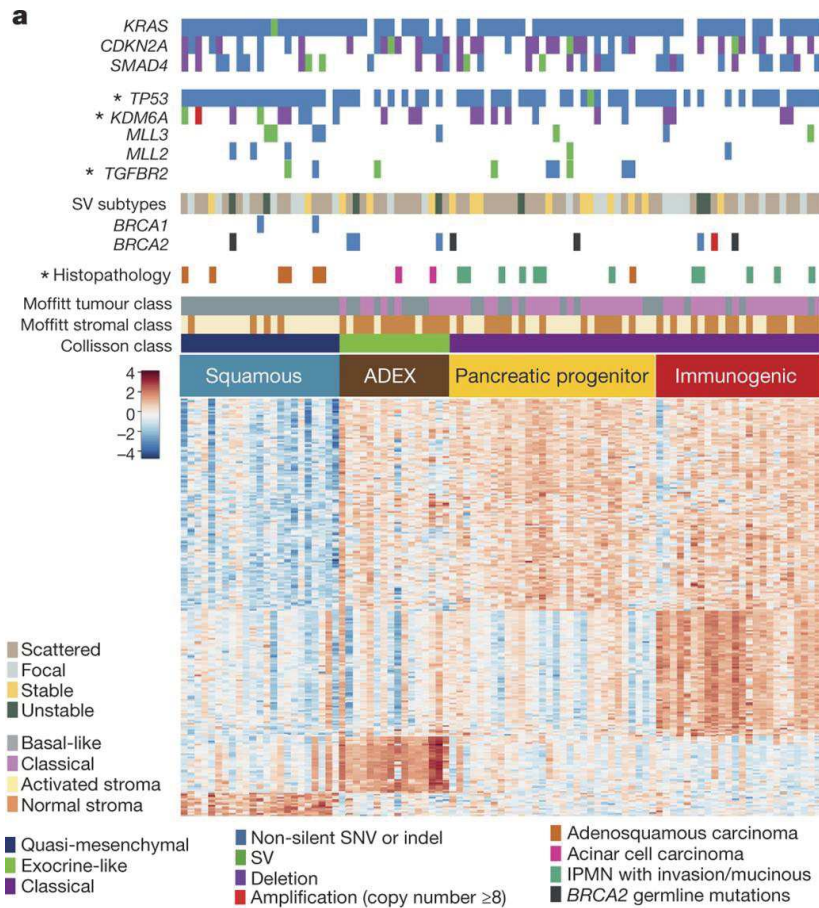


Figure 13: Etude de stratification des adénocarcinomes pancréatiques.
 Le séquençage de 456 tumeurs a permis d'identifier 4 sous-types d'adénocarcinome pancréatique : squameux, progéniteur pancréatique, immunogène et ADEX. (Bailey et al. 2016)

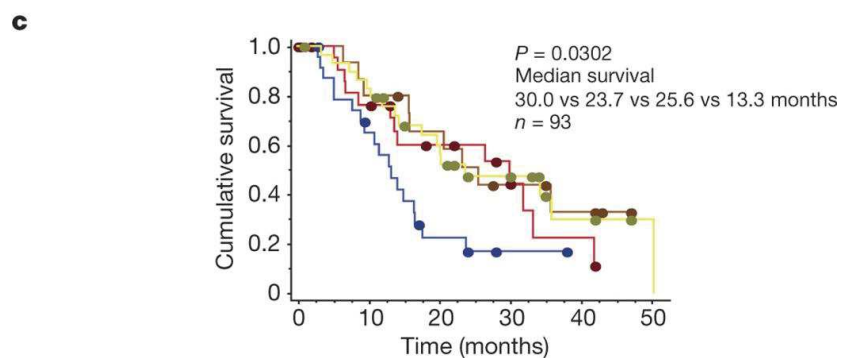


Figure 14 : Courbes de survie selon le sous-type d'adénocarcinome pancréatique.
 Les médianes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. (Bailey et al. 2016)

En 2018, une nouvelle classification se basant sur les caractéristiques génomiques, transcriptomiques et immunohistochimiques de la tumeur et de son microenvironnement a été publiée (Puleo et al. 2018). Trois cent neuf patients opérés d'un adénocarcinome pancréatique ont été inclus. Cinq sous-types ont été mis en évidence : pure basal, stroma activated, desmoplastic, pure classical et immune classical. Le sous-type pure classical est associé au meilleur pronostic et le sous-type pure basal à celui le plus sombre (Figure 15). Chaque sous-type présente un pronostic différent ainsi que des caractéristiques propres qui pourraient servir dans le futur à prédire l'efficacité de certains traitements.

Median survival (in months) [95% CI]	OS	DFS	ICGC OS
Pure basal-like	10.3 [8.36, 17.3]	4.57 [3.75, 6.32]	10.1 [8.55, 14.8]
Stroma activated	20.2 [15.03, 26.8]	10.69 [9.97, 12.24]	16.3 [13.91, 27.5]
Desmoplastic	24.3 [21.81, 35.1]	12.93 [11.78, 17.5]	17.2 [15.25, 25.9]
Immune classical	37.4 [23.75, inf]	21.09 [13.09, inf]	31 [17.19, inf]
Pure classical	43.1 [35.33, 92.3]	20.13 [14.7, 34.51]	30 [18.51, 39.5]

Figure 15 : Courbes de survie selon le sous-type d'adénocarcinome pancréatique.
Les médianes de survie globale et survie sans récurrence ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. (Puleo et al. 2018)

1.3.6.2. Mutation activatrice de l'oncogène KRAS

La mutation activatrice de *KRAS* est la plus précoce des modifications génétiques dans l'adénocarcinome pancréatique et est présente dans 90 % des cas (Hingorani et al. 2003). La mutation de *KRAS* survient majoritairement sur le codon 12 par le remplacement d'une glycine par un acide aspartique ou une valine. La présence de cette mutation inhibe l'activité GTPasique, ce qui entraîne une liaison constante de RAS au GTP et donc son activation

constitutive (Jackson et al. 2001). Cette activation constitutive favorise le développement de tumeurs par des signaux de croissance et de survie cellulaire via la voie des MAP kinases et la voie PI3K-AKT.

1.3.6.3. Perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs

Ces gènes sont capables de bloquer le cycle cellulaire et ainsi inhiber la prolifération cellulaire. Une perte de fonction entraîne une levée du pouvoir inhibiteur de ces gènes sur le cycle cellulaire, les cellules prolifèrent sans contrôle, ce qui favorise le développement de tumeurs.

La perte de fonction de *P16* (*CDKN2A*) est mise en évidence dans 80 % des adénocarcinomes pancréatiques. Le gène *P16* est impliqué dans le cycle cellulaire en inhibant CDK 4/6, ce qui bloque le cycle cellulaire en phase G1/S (Lebart et Mariani 2004).

Le gène *SMAD4* code pour un facteur de transcription essentiel dans la voie du TGF β et est inactivé dans 50 % des adénocarcinomes pancréatiques (Delpu et al. 2011). Cette perte de fonction induit une levée de l'effet inhibiteur du TGF β sur la prolifération des cellules tumorales.

La mutation de *P53* est mise en évidence dans 50 % des adénocarcinomes pancréatiques. A l'état physiologique, P53 est activé lors d'altérations génétiques et permet d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1/S et permet ainsi de laisser le temps de réparer les dommages à l'ADN. Si ces dommages sont trop importants, P53 permet d'orienter la cellule vers l'apoptose. En cas de perte de fonction de P53, les dommages à l'ADN ne sont pas réparés, ce qui induit l'accumulation d'altérations génétiques et favorise le développement de tumeurs.

1.3.7. Prise en charge diagnostique

1.3.7.1. Diagnostic clinique

Les symptômes de l'adénocarcinome pancréatique sont dépendants de la localisation de la tumeur.

Les trois symptômes les plus fréquents en cas de tumeur de la tête du pancréas sont l'ictère, la douleur et l'altération de l'état général.

- L'ictère est de type rétionnel, d'apparition progressive, sans fièvre ni douleur. Il peut être précédé d'une cholestase anictérique associée à un prurit. Une hépatomégalie, secondaire à la cholestase et/ou un hydrocholécyste peuvent être palpés.
- La douleur est de siège épigastrique, elle est dite « solaire », transfixiante, progressive, insomnante et intense. La douleur, souvent absente au début de l'évolution traduit un envahissement local lors de sa survenue. Elle nécessite rapidement le recours à un traitement antalgique par des dérivés morphiniques.
- L'altération de l'état général est marquée par un amaigrissement important et rapide.

Les symptômes peuvent être atypiques : angiocholite, pancréatite aiguë dans moins de 10 % des cas, douleurs avec irradiation dorsale suggérant une affection rhumatologique, vomissements ou occlusion révélant une sténose duodénale.

Les adénocarcinomes de la partie gauche du pancréas (corps et queue) sont plus rares, ils sont révélés par un syndrome douloureux traduisant un envahissement postérieur du plexus solaire. L'altération de l'état général est souvent majeure.

L'apparition ou l'aggravation d'un diabète chez un homme de plus de 40 ans, sans antécédent familial de diabète et sans obésité, doit faire évoquer le diagnostic d'adénocarcinome du pancréas.

Le cancer du pancréas favorise les thromboses veineuses. La survenue d'une thrombose veineuse profonde ou d'une embolie pulmonaire, en dehors d'un contexte favorisant, doit également faire évoquer le diagnostic d'adénocarcinome du pancréas.

1.3.7.2. Diagnostic biologique

Le CA 19.9 est un marqueur non spécifique de l'adénocarcinome du pancréas. En effet, il n'a ni spécificité d'organe, ni spécificité vis-à-vis des affections malignes. Le CA 19.9 est sécrété par le pancréas normal mais également dans les épithélia de nombreux tissus dont l'épithélium biliaire, gastrique, œsophagien et colique (Arends et al. 1983), voire vésical. Une élévation du taux sanguin de CA 19.9 peut être mise en évidence lors d'une affection bénigne ou maligne de chacun de ces organes. En cas de cholestase, une élévation de son taux sérique peut également être observée. Il peut être néanmoins utile pour le suivi sous traitement.

Le bilan biologique peut mettre en évidence une cholestase et/ou un déséquilibre du diabète.

1.3.7.3. Imagerie

L'échographie abdominale reste l'examen de première intention dans le cadre d'un bilan d'ictère. La performance diagnostique de cet examen est dépendante de l'opérateur, de la taille et de la localisation de la lésion initiale, mais également des limites classiques de l'échographie telles que l'obésité et les interpositions digestives. Sa sensibilité pour le diagnostic d'adénocarcinome du pancréas varie entre 75 et 89 % et sa spécificité entre 90 et 99 % (Conrad et Fernández-Del Castillo 2013).

Le scanner spiralé avec injection de produit de contraste est l'examen de référence à réaliser en première intention pour le diagnostic de tumeur pancréatique (Al-Hawary et al. 2014), ainsi que l'évaluation de l'envahissement loco-régional notamment l'envahissement vasculaire, l'envahissement ganglionnaire et la recherche de localisations secondaires. Les

signes fréquemment observés sont une lésion hypodense, une dilatation du canal pancréatique principal, une obstruction canalaire, une atrophie pancréatique distale, des anomalies de contour du pancréas et une dilatation de la voie biliaire principale et/ou des voies biliaires intra-hépatiques (Ahn et al. 2009). Sa sensibilité est de 90 % pour le diagnostic de cancer du pancréas (Zins et al. 2005), mais 20 à 30 % des cancers du pancréas de diamètre inférieur ou égal à 20 mm demeurent méconnus lors de cet examen.

Concernant la tomодensitométrie par émission de positrons au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (TEP-FDG), son intérêt n'est démontré ni dans le diagnostic initial ni dans le bilan de résecabilité. Sa place reste donc actuellement à valider. Ses limites sont la possibilité de faux négatifs en cas d'hyperglycémie, et de faux positifs chez des patients présentant une lésion inflammatoire secondaire à une pancréatite.

La sensibilité de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est de 83 à 85 %, et sa spécificité de 63 % pour le diagnostic de tumeur du pancréas (Park et al. 2009). L'adénocarcinome pancréatique correspond à une tumeur hypovasculaire, hypo-intense en pondération T1 avec saturation de graisse avant injection et à la phase artérielle, un rehaussement tardif est observé. Les autres signes visibles sont la disparition des contours lobulés en regard de la tumeur, une dilatation canalaire, par exemple une dilatation de la voie biliaire principale et du canal pancréatique principal pour une tumeur de la tête du pancréas s'accompagnant d'une sténose en regard de la lésion. L'IRM peut permettre le bilan d'extension vasculaire, ganglionnaire et à distance. Une étude prospective multicentrique française évaluant la sensibilité de l'IRM avec séquence de diffusion pour la détection de métastases chez des patients ayant un adénocarcinome pancréatique potentiellement résecable, a montré la détection de lésions secondaires hépatiques dans 10 % des cas non vues par le scanner (Marion-Audibert et al. 2018). L'IRM est donc recommandée pour tout patient candidat à une chirurgie afin de diminuer le nombre de faux négatifs dans la recherche de localisations secondaires hépatiques.

L'écho-endoscopie est indiquée pour le diagnostic des tumeurs pancréatiques de petite taille (< 1 cm). Elle permet également d'obtenir une histologie en cas de tumeur inopérable ou lorsqu'un traitement néo-adjuvant est envisagé. Quand le diagnostic de tumeur maligne est évoqué et que celle-ci est opérable, une résection chirurgicale est discutée d'emblée. Pour le diagnostic de cancer du pancréas, la sensibilité de l'écho-endoscopie est de 94 % et sa spécificité de 89 % (Gong et al. 2012).

1.3.8. Prise en charge thérapeutique

A l'issue du diagnostic, la tumeur pancréatique peut être classée en plusieurs catégories selon la classifications du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Tempero et al. 2014) : tumeur résécable, tumeur « borderline », tumeur localement avancée et tumeur non résécable. La prise en charge thérapeutique sera fonction de cette classification.

1.3.8.1. Tumeurs résécables

Une tumeur résécable se définit anatomiquement par l'absence de métastase à distance, la présence d'un liseré graisseux entre la tumeur, l'axe cœliaque, l'artère hépatique et l'artère mésentérique supérieure, et l'absence de contact de la tumeur avec la veine mésentérique supérieure ou la veine porte ou un contact veineux $\leq 180^\circ$ sans irrégularité du contour de la veine.

La résection chirurgicale de la tumeur est le seul traitement à visée curative. Le choix de la technique dépend de la localisation initiale de la tumeur.

L'approche thérapeutique standard actuelle en situation adjuvante est celle de la chimiothérapie adjuvante par FOLFIRINOX modifié ou Gemcitabine selon l'état général du patient, pendant 6 mois, quel que soit le stade de la tumeur et que la résection soit R0 ou R1 (R0 : résection complète et absence d'envahissement des marges de résection, R1 : envahissement microscopique des marges de résection) (Oettle et al. 2007; Conroy et al. 2018;

Oettle et al. 2013). Le protocole de chimiothérapie FOLFIRINOX correspond à l'association de trois composants : le 5FU, antimétabolite analogue des bases pyrimidiques ; l'oxaliplatine, sel de platine ; et l'irinotécan, inhibiteur de l'ADN topoisomérase 1. La Gemcitabine appartient à la classe des antimétabolites, son action cytotoxique est due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN.

1.3.8.2. Tumeurs dites « borderline »

Selon le NCNN, les tumeurs dites « borderline » sont définies par une atteinte veineuse limitée en longueur et/ou une atteinte artérielle limitée en circonférence.

Chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique borderline, l'intérêt théorique d'un traitement d'induction est d'entraîner une régression de la tumeur dans le but d'augmenter les possibilités de résection secondaire R0 et d'obtenir un allongement de la SG. L'étude de phase III PREOPANC a confirmé la faisabilité de la chimio radiothérapie (CRT) préopératoire versus chirurgie d'emblée ; la SG médiane est de 16 mois avec la CRT préopératoire contre 14,3 mois avec la chirurgie première, le taux de résection R0 est plus élevé en cas de traitement préopératoire (71 % contre 40 %, $p < 0,001$) (Versteijne et al. 2020). Des études évaluant des stratégies pré-opératoires par FOLFIRINOX ou Gemcitabine plus nab-placlitaxel sont en cours.

1.3.8.3. Tumeurs localement avancées

Une tumeur du pancréas localement avancée se caractérise par un contact ou une atteinte vasculaire (veineuse ou artérielle) contre indiquant une résection chirurgicale.

A l'heure actuelle, le traitement des formes localement avancées d'adénocarcinome pancréatique reste théoriquement la chimiothérapie par Gemcitabine (Neuzillet et al. 2018). L'essai randomisé de phase III PRODIGE 29 – NEOPAN est en cours et compare une chimiothérapie par FOLFIRINOX à la Gemcitabine dans cette indication.

Sur la base des résultats de l'étude LAP-07, la CRT avec Capécitabine de « clôture » est une option à discuter chez les patients traités par chimiothérapie avec contrôle tumoral local (Hammel et al. 2016).

1.3.8.4. Tumeurs non résécables

Depuis la publication des résultats des études de phase III, PRODIGE 4 et MPACT, en 2011 et 2013, les chimiothérapies par FOLFIRINOX et Gemcitabine + nab-Paclitaxel sont devenues les nouveaux standards en 1ère ligne pour les patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas métastatique. Ces protocoles de chimiothérapie ont tous les deux démontré leur supériorité par rapport à la Gemcitabine en monothérapie pour le taux de réponse objective, la survie sans progression (SSP) et la survie globale (Conroy et al. 2011; Von Hoff et al. 2013). Il n'existe à ce jour aucune étude ayant comparé directement le FOLFIRINOX à la combinaison nab-Paclitaxel + Gemcitabine.

La Gemcitabine reste l'alternative pour les patients non éligibles à ces protocoles (Burriss et al. 1997).

1.3.9. Perspectives thérapeutiques

Les adénocarcinomes pancréatiques associés aux mutations germinales de *BRCA1/2* (5 %) ont pour caractéristiques d'être sensibles aux composés dérivés du platine et aux inhibiteurs de PARP. L'étude de phase III POLO a évalué, chez 154 patients ayant une mutation germinale de *BRCA1* ou *BRCA2* et une maladie contrôlée après au moins 4 mois de chimiothérapie, un traitement de maintenance par Olaparib versus placebo. La SSP était doublée avec l'Olaparib (7,4 mois contre 3,8 mois, $p=0,0038$) (Golan et al. 2019). Il s'agit de la première étude de thérapie ciblée positive dans l'adénocarcinome pancréatique.

Par ailleurs, à l'exception des tumeurs présentant une instabilité des microsatellites (MSI) (< 1-2 %), l'adénocarcinome pancréatique présente un microenvironnement unique qui est

défavorable aux lymphocytes T anti-tumoraux et à l'activité des inhibiteurs de checkpoint immunitaire. Il appartient au groupe des tumeurs faiblement immunogènes (Hilmi et al. 2018). Des combinaisons thérapeutiques à base de vaccins, virus oncolytiques, combinaisons d'inhibiteurs de checkpoint immunitaire, ciblage des cytokines et cellules immunosuppressives, de l'hypoxie, des fibroblastes, CAR-T cells, sont en cours d'exploration.

1.3.10. Modèles précliniques d'étude de la cancérogenèse pancréatique

Afin de reproduire les altérations génétiques retrouvées dans les adénocarcinomes pancréatiques humains et d'étudier les mécanismes moléculaires responsables de leur progression, plusieurs modèles d'adénocarcinomes pancréatiques ont été développés chez l'animal.

1.3.10.1. Modèle Pdx1-Cre ; Kras

La mutation *KRAS* est mise en évidence dans 75 à 95 % des cancers du pancréas et dans les lésions précancéreuses de type PanIN ou TIPMP. Ces lésions ont été reproduites dans des modèles transgéniques établis chez la souris à partir de la mutation de *KRAS*, il s'agit des souris Pdx1-Cre ; Kras^{G12D}. La mutation Kras^{G12D} est introduite après une cassette Lox-Stop-Lox (LSL), empêchant la transcription, dans un allèle du gène de *RAS*. Il s'agit d'induire une substitution de l'acide aminé glycine en acide aspartique au niveau du codon 12 de la protéine. KRAS est induit après excision de la cassette LSL par la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur du facteur PDX1, spécifique des cellules souches pancréatiques (Figure 16) (Hingorani et al. 2003). La mutation KRAS a également été induite sous le contrôle du promoteur du facteur PTF1A (Siveke et al. 2007).

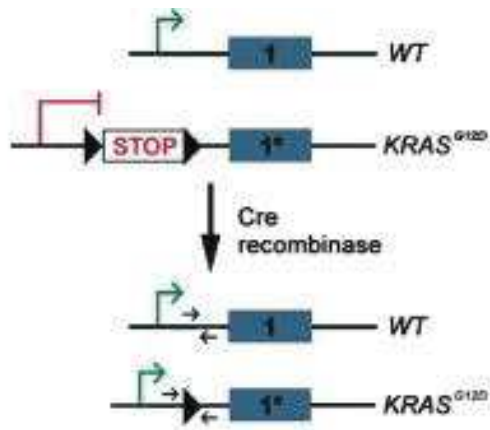


Figure 15 : Représentation schématique de l'expression conditionnelle de la mutation $Kras^{G12D}$ dans un modèle murin.

La mutation $Kras^{G12D}$ est introduite après une cassette Lox-Stop-Lox (LSL), empêchant la transcription, dans un allèle du gène de RAS. $Kras$ est induit après excision de la cassette LSL par la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du facteur PDX1, spécifique des cellules souches pancréatiques. (Hingorani et al. 2003)

Ces souris expriment dès le stade embryonnaire E8,5 le mutant $Kras^{G12D}$. Cent pour cent des souris reproduisent les PanIN de tous grades, ce qui confirme le rôle initiateur joué par l'oncogène $KRAS$ dans la carcinogénèse pancréatique. Des lésions de type métaplasie acino-canalaire ont également été mises en évidence aux différents grades de PanIN. Dix pour cent des souris développent des tumeurs pancréatiques à un âge avancé. Dans l'hypothèse de la nécessité d'un évènement additionnel pour que les lésions précancéreuses progressent jusqu'au stade de cancer, des modèles ont été générés en combinant la mutation de $KRAS$ avec d'autres altérations génétiques (Bournet et al. 2013).

1.3.10.2. Modèle Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; p53^{R172H/+}

Un premier modèle a combiné l'activation de *KRAS* avec l'inactivation conditionnelle du gène *TP53* dans le but de modéliser le développement de l'adénocarcinome pancréatique (Hingorani et al. 2005). La mutation hétérozygote de *TP53* permet aux lésions néoplasiques initiées par *KRAS* d'évoluer plus rapidement vers des lésions de haut grade. Dans ce contexte, les animaux avaient une survie médiane de 5,5 mois.

1.3.10.3. Modèle Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; p53^{lox/lox}

Un deuxième modèle a combiné l'activation de *KRAS* avec l'inactivation du gène *TP53* (Bardeesy et al. 2006). L'apparition rapide d'adénocarcinomes pancréatiques invasifs multiples a été observée grâce à ce modèle, ces tumeurs étaient principalement bien différenciées.

1.3.10.4. Modèle Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; Smad4^{lox/lox}

Le gène suppresseur de tumeur *SMAD4* code pour un facteur de transcription qui est un régulateur central de la voie du TGF- β . Contrairement aux modèles précédents, l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *SMAD4* associée à la mutation de *KRAS* induit le développement de TIPMP et de cystadénomes mucineux (Kojima et al. 2007). Des lésions évocatrices de métaplasie acino-canalaire ont également été décrites (Bardeesy et al. 2006).

1.3.10.5. Modèle Pdx1-Cre ; Kras^{G12D} ; Ink4a/Arf^{lox/lox}

Ce modèle présente une délétion homozygote du locus *CDKN2A*, codant pour P16 et P19, combinée à la mutation de *KRAS*. Ces souris triples transgéniques développent des adénocarcinomes pancréatiques métastatiques, entraînant le mort de la totalité des animaux à 11 semaines (Aguirre et al. 2003).

1.3.10.6. Modèle chimio-induit : la pancréatite induite par la Céruléine

La pancréatite aigüe ou chronique peut être induite chez le rongeur par divers facteurs, dont la Céruléine est la méthode la plus utilisée (Kim 2008). C'est un décapeptide analogue de la CCK. La Céruléine est injectée par voie intra-péritonéale chez la souris. La répétition des injections conduit à des dommages intracellulaires des acini et à des réponses inflammatoire et systémique. L'induction de pancréatites aigües répétées peut conduire à une pancréatite chronique.

Lorsque le modèle de souris Pdx1-Cre ;Kras est soumis à des injections intra-péritonéale de Céruléine, ceci permet une évolution des lésions de type PanIN en adénocarcinome pancréatique dans un tiers des cas (Guerra et al. 2007). L'inflammation semble donc jouer un rôle important dans la cancérogenèse pancréatique.

Le diagnostic précoce des cancers du pancréas ainsi que le développement de thérapies innovantes sont des objectifs majeurs de la recherche en cancérologie pancréatique. La connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans la cancérogenèse est donc indispensable.

1.4. Le gène homéotique *CDX2*

1.4.1. Caractéristiques de *CDX2*

Caudal-related homeobox 2 (*CDX2*) est un homologue du gène homéotique Caudal, identifié chez *Drosophila melanogaster* et impliqué dans la spécification et l'identité postérieure de l'embryon (Mlodzik et Gehring 1987). Les gènes homéotiques codent pour des facteurs de transcription qui jouent un rôle clé dans le développement embryonnaire. Ces facteurs de transcription possèdent un homéodomaine correspondant à un segment de 60 acides aminés riche en acides aminés basiques qui s'organise en 3 hélices α pour former le domaine de liaison à l'ADN. L'homéodomaine est codé par une séquence de 180 paires de bases qui est conservée dans la famille des gènes homéotiques. Certains de ces gènes restent exprimés à l'âge adulte pour contrôler l'homéostasie tissulaire et peuvent être associés au processus d'oncogenèse lorsque leur expression est dérégulée (Abate-Shen 2002).

Il existe deux familles de gènes homéotiques, les gènes Hox et les gènes ParaHox organisés en cluster ou dispersés dans le génome. Les 39 gènes du type Hox sont regroupés en 4 clusters (A, B, C et D). Il existe également 6 gènes du type ParaHox *GSX1*, *GSX2*, *PDX1*, *CDX1*, *CDX2* et *CDX4*. Les gènes *GSX1*, *PDX1* et *CDX2* sont regroupés en cluster et *GSX2*, *CDX1* et *CDX4* sont dispersés sur des chromosomes différents (Garcia-Fernández 2005; Holland 2001). Le gène homéotique *CDX2* est localisé sur le chromosome 5 chez la souris (Chawengsaksophak et Beck 1996) et sur le bras long du chromosome 13 (13q12-q13) chez l'homme (Drummond et al. 1997).

Le gène *CDX2* est constitué de trois exons séparés par deux introns et s'étend sur environ 7.2 kb. La protéine correspondante est constituée de 313 acides aminés et comporte trois domaines fonctionnels (Figure 17). Le domaine de transactivation correspond à la moitié N-terminale de la protéine et comprend un site de phosphorylation qui module l'activité

transcriptionnelle en liant différents partenaires (Rings et al. 2001). L'homéodomain assure la liaison de CDX2 au promoteur de ses gènes cibles, au niveau d'une séquence consensus A/CTTTATATA/G parfois soumise à des modifications mineures (Margalit et al. 1993; Verzi et al. 2010). Enfin, l'extrémité C-terminale comporte des sites de phosphorylation qui régulent la stabilité de la protéine (Gross et al. 2005).

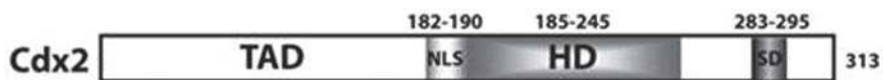


Figure 16: Représentation schématique de la protéine CDX2 humaine.

Les chiffres du haut correspondent à la position des différents domaines le long des 313 acides aminés de la protéine CDX2. TAD: transactivator domain; NLS: nuclear localization signal; HD: homeodomain ; SD : stabilization domain.(Renouf et al. 2012)

Différentes isoformes générées par épissage alternatif (Witek et al. 2014; Balbinot et al. 2017) de CDX2 ont été décrites. Un variant d'épissage alternatif de CDX2, Cdx2/AS (Witek et al. 2014) résulte d'un changement de phase de lecture et est caractérisé par un domaine homéotique de liaison à l'ADN tronqué et un domaine C-terminal riche en résidus sérine et arginine qui présente environ 30% d'homologie avec les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR. Ce variant est inactif sur les cibles transcriptionnelles de CDX2 mais stimule in vitro et in vivo l'épissage de minigènes.

Par ailleurs, notre équipe a mis en évidence l'existence d'un autre variant d'épissage alternatif de CDX2, miniCdx2, comprenant le domaine de liaison à l'ADN de CDX2 mais dépourvu du domaine de transactivation. L'extrémité N-terminale de miniCdx2 est réduite à quelques acides aminés (Figure 18). Ce variant se comporte comme un dominant négatif sur les cibles transcriptionnelles de CDX2 et exerce des activités à la fois antagonistes et similaires à celles de CDX2 (Balbinot et al. 2017).



Figure 17: Représentation schématique de la protéine humaine miniCDX2.

TA: transactivation domain; *HD*: DNA-binding homeodomain; *R*: regulatory domain. La flèche montre la petite séquence peptidique de 12 acides aminés remplaçant le domaine de transactivation de 185 acides aminés. (Balbinot et al. 2017)

1.4.2. Expression et fonctions physiologiques de *CDX2*

Le gène *CDX2* présente un profil d'expression complexe qui débute au stade blastula au niveau des cellules du trophoblaste à l'origine des annexes extra-embryonnaires. L'expression embryonnaire apparaît peu après la gastrulation suivant un gradient antéro-postérieur croissant. *CDX2* intervient dans l'élongation postérieure de l'embryon et la détermination de l'axe antéro-postérieur. A partir de la mi-gestation chez la souris, cette expression disparaît progressivement dans tous les tissus sauf au niveau de la partie médiane et postérieure de l'endoderme dont dérive la monocouche épithéliale de l'intestin formant le grêle et le côlon (Gao et al. 2009). Son expression est maintenue tout au long de la vie adulte dans l'épithélium intestinal en constant renouvellement cellulaire à partir des cellules souches (Silberg et al. 2000). Elle suit un gradient d'expression croissant du duodénum vers le côlon proximal, puis décroissant au niveau du côlon distal (Benahmed et al. 2008).

Les fonctions de *CDX2* ont été déterminées par invalidation génique chez la souris. L'invalidation constitutive entraîne la mort des embryons *Cdx2*^{-/-} vers E3,5 par défaut de nidation en raison du dysfonctionnement du trophoctoderme (Chawengsaksophak et al. 1997). La complémentation de la fonction trophoctodermique par agrégation tétraploïdique prolonge la survie des embryons *Cdx2*^{-/-} au-delà de la gastrulation et l'analyse de ces mutants montre que ce gène homéotique est essentiel pour l'élongation et le « patterning » de la partie

postérieure (Chawengsaksophak et al. 2004). La fonction de *CDX2* dans l'endoderme et l'épithélium intestinal a été établie en croisant des souris portant les allèles « floxés » du gène *CDX2* et des souris permettant d'activer la recombinaison Cre sélectivement dans les cellules intestinales au stade souhaité. L'inactivation sélective dans l'endoderme embryonnaire empêche la différenciation intestinale au profit d'une différenciation gastro-œsophagienne, ce qui démontre que *CDX2* est le gène qui détermine l'identité intestinale de l'endoderme moyen et postérieur (Gao et al. 2009; Grainger et al. 2010).

Chez l'adulte, *CDX2* est exprimé au niveau de l'épithélium intestinal selon un gradient d'expression antéro-postérieur. Il s'exprime au niveau des cellules différenciées des villosités et dans les cellules souches des cryptes. *CDX2* ne s'exprime pas dans les cellules de Paneth (Silberg et al. 2000). Au stade adulte, l'inactivation dans l'ensemble de l'épithélium intestinal ou spécifiquement dans les cellules souches montre que *CDX2* est indispensable à l'homéostasie intestinale : il participe à l'organisation cellulaire de la niche des cellules souches, confère l'identité intestinale aux cellules souches, contrôle le compartiment de prolifération cellulaire et assure la différenciation des cellules épithéliales intestinales des lignages absorbants et sécréteurs (Verzi et al. 2011; Stringer et al. 2012).

La complexité des fonctions cellulaires exercées par le gène *CDX2* dans l'intestin se traduit par la multiplicité des cibles moléculaires de la protéine *CDX2*. En effet, ce facteur de transcription interagit avec plus de 14 000 sites sur la chromatine et contrôle l'expression de plus de 5000 gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que dans la polarité et la différenciation des cellules épithéliales intestinales matures (Verzi et al. 2010).

Parallèlement à cette activité transcriptionnelle, *CDX2* possède une activité non transcriptionnelle reposant sur des phénomènes d'interaction avec d'autres protéines. *CDX2* est capable d'inhiber la réparation de type NHEJ des lésions doubles brins de l'ADN en

interagissant avec les protéines KU70/80 (Renouf et al. 2012) et HoxB7 (Soret et al. 2016). De même, en se liant à NF- κ B ou à la β -caténine, CDX2 peut bloquer la synthèse de prostaglandines et l'expression des gènes de la voie WNT, potentiellement impliqués dans les phénomènes de réponse inflammatoire et de cancérogenèse colique (Guo et al. 2010; Mutoh et al. 2007).

1.4.3. CDX2 dans les cancers colorectaux

Il a été montré que l'expression de CDX2 est diminuée et hétérogène dans le cancer du côlon (Brabletz et al. 2004; Subtil et al. 2007; Dalerba et al. 2016). Cette diminution est corrélée à un mauvais pronostic et à une réduction de la survie sans progression (Figure 19) (Baba et al. 2009; De Sousa E Melo et al. 2013; Dalerba et al. 2016).

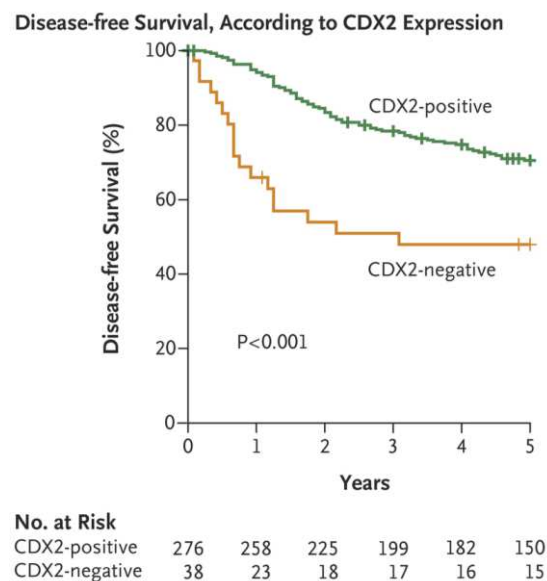


Figure 18 : Courbes de survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans le cancer du côlon.

Les tumeurs du côlon CDX2 négative sont associées à un plus mauvais pronostic que celles CDX2 positive. (Dalerba et al. 2016)

Des études réalisées chez la souris ont montré qu'une diminution ou la perte de son expression contribue à la progression tumorale dans des modèles de cancers de l'intestin chimio-induits (Bonhomme et al. 2003) ou génétiques (Aoki et al. 2003; Aoki et al. 2011; Hryniuk et al. 2014; Sakamoto et al. 2017; Balbinot et al. 2018). La perte de Cdx2 favorise également la dissémination des cellules malignes coliques (Gross et al. 2008). De multiples mécanismes de régulation sont susceptibles de perturber l'expression de CDX2 dans les cancers colorectaux en fonction des altérations moléculaires spécifiques des cellules tumorales ainsi que de leur microenvironnement. *CDX2* a donc un rôle suppresseur de tumeurs dans l'intestin.

1.4.4. *CDX2* et résistance à la chimiothérapie

Dans le cancer colorectal, il a été montré que l'administration d'une chimiothérapie chez des patients dont les tumeurs avaient perdu l'expression de CDX2 améliorait significativement la survie sans récurrence comparée à des patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie (Dalerba et al. 2016). Cependant, cet effet bénéfique de la chimiothérapie était nettement diminué (tumeurs de stade II), voire annulé (tumeurs de stade III), pour les patients dont les tumeurs exprimaient CDX2 (Dalerba et al. 2016). Dans la méta-analyse de Yuan et al., le gain de survie globale chez les patients dont les tumeurs exprimaient CDX2 ne semblait pas attribuable à une meilleure réponse à la chimiothérapie puisque, dans cette même étude, le niveau d'expression de CDX2 ne modifiait pas les effets de la chimiothérapie chez des patients qui en avaient reçu, quelle que soit l'origine tumorale (cancer du côlon ou de l'ovaire) (Yuan et al. 2017). Donc, bien qu'un rôle suppresseur de tumeur soit attribué à *CDX2* dans l'intestin, le niveau d'expression de ce gène ne semble pas influencer la réponse à la chimiothérapie.

1.4.5. Expression ectopique de *CDX2*

Physiologiquement, l'expression de *CDX2* est restreinte à l'épithélium intestinal chez l'adulte mais ce gène peut s'exprimer de manière ectopique dans un certain nombre d'organes

d'origine endodermique dans des contextes pathologiques associés à une inflammation chronique et dans le système hématopoïétique dans certaines leucémies (Freund et al. 2015).

Chez l'homme, l'expression ectopique de CDX2 est corrélée au développement d'une métaplasie intestinale, comme dans le cas de l'œsophage de Barrett et de la métaplasie intestinale de l'estomac. Chez la souris, l'induction ectopique de Cdx2 dans l'endoderme/épithélium gastrique chez l'embryon ou le nourrisson transforme cet épithélium en épithélium intestinal (Silberg et al. 2000; Mutoh et al. 2002); le même effet, bien que moins important, est observé lorsqu'une expression ectopique de Cdx2 est induite au stade embryonnaire dans l'endoderme œsophagien (Kong et al. 2011). Cdx2 joue donc un rôle dans la trans-différenciation intestinale anormale de la muqueuse gastrique et œsophagienne. La métaplasie intestinale étant considérée comme une lésion précancéreuse, l'hypothèse a été émise d'un rôle pro-oncogénique de *CDX2* en situation ectopique, contrairement à son rôle suppresseur de tumeurs dans l'intestin. Néanmoins, à l'image de ce qui est observé au cours de la cancérogenèse colique, l'expression de *CDX2* diminue lors de la progression des métaplasies intestinales en adénomes puis en cancers gastriques (Kim et al. 2006; Park et al. 2010; Xin et al. 2007). De plus, une expression conservée de *CDX2* dans les cancers gastriques est associée à un bon pronostic, ce qui suggère que *CDX2* pourrait exercer une fonction suppresseur de tumeurs dans les cancers gastriques établis (Mizoshita et al. 2003; Wang et al. 2012).

Une expression ectopique de *CDX2* a également été décrite dans plus de 80 % des leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes et est associé à un mauvais pronostic (Scholl et al. 2007; Thoene et al. 2009). Tandis que l'inhibition de l'expression de *CDX2* par shARN dans différentes lignées leucémiques induit une diminution de la prolifération cellulaire et du pouvoir clonogénique in vitro (Scholl et al. 2007; Thoene et al. 2009), l'expression forcée de *CDX2* dans les cellules de moelle osseuse transplantées à des souris irradiées conduit au développement d'une leucémie aiguë myéloïde et à la mort des animaux (Rawat et al. 2004;

Scholl et al. 2007). Récemment, un modèle d'induction de l'expression de CDX2 dans les cellules souches hématopoïétiques chez la souris a mis en évidence le développement de myélodysplasies pouvant évoluer en leucémies (Vu et al. 2020). Ces résultats montrent que *CDX2* exerce une activité oncogénique en situation d'expression ectopique dans le système hématopoïétique.

Une expression ectopique de CDX2 a par ailleurs été rapportée dans différents types de cancers, tels que les adénocarcinomes du pancréas, de l'œsophage, de l'estomac, de la vessie, dans des cholangiocarcinomes, ainsi que dans de rares cas de cancers ovariens, des poumons, de la prostate, de la fente olfactive (Figure 20) (Franchi et al. 2004; Moskaluk et al. 2003; Saad et al. 2011; Vang et al. 2006; Werling et al. 2003).

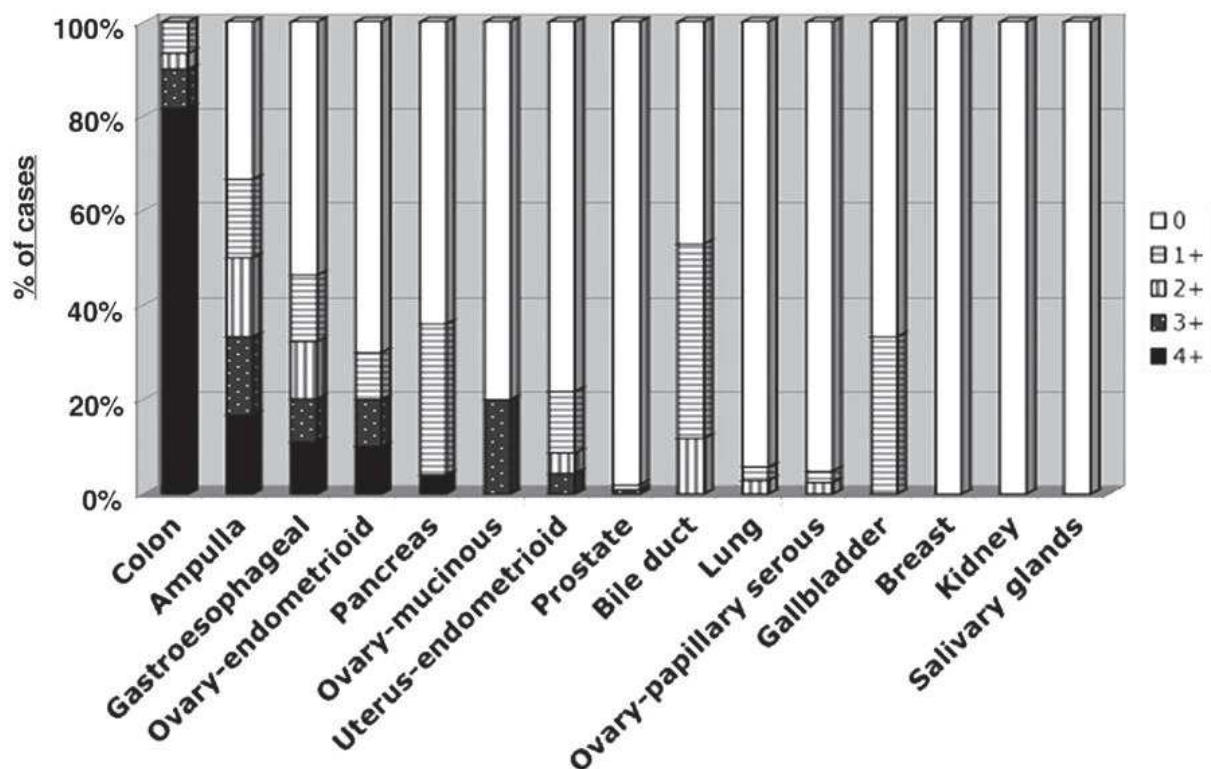


Figure 19: Expression de CDX2 dans différents types d'adénocarcinomes.
L'analyse de l'expression de CDX2 a été réalisée par immunohistochimie. L'immunomarquage était classé de 0 à 4 selon le pourcentage de cellules marquées (par ordre croissant). (Moskaluk et al. 2003)

Dans le cas du pancréas, plusieurs études ont mis en évidence une expression ectopique de CDX2 dans des lésions précancéreuses et dans des adénocarcinomes, mais son rôle reste controversé. Xiao et al. ont étudié l'expression de CDX2 par immunohistochimie (IHC) dans des adénocarcinomes canauxiers du pancréas ainsi que des lésions précurseurs PanIN (Xiao et al. 2014). Ils ont noté une expression ectopique de CDX2 dans un tiers des cas d'adénocarcinome du pancréas, expression qui était corrélée à une diminution significative de la survie médiane. A l'inverse, un travail de Matsumoto et al. publié en 2004 suggérait que l'expression de CDX2 dans les adénocarcinomes canauxiers du pancréas était associée à un meilleur pronostic (Matsumoto et al. 2004). Une étude récente a analysé l'expression de CDX2 dans des métastases hépatiques d'adénocarcinome pancréatique (n=77). L'analyse a montré que l'absence d'expression de CDX2 dans les métastases hépatiques était associée à un meilleur pronostic (Held et al. 2019).

1.4.6. Mécanismes moléculaires de l'induction de l'expression de *CDX2*

L'ensemble de ces résultats montre que CDX2 est un facteur de transcription pouvant exercer des fonctions opposées en termes de cancérogénèse. Ainsi, alors qu'il est suppresseur de tumeurs dans son site d'expression physiologique, l'intestin, CDX2 peut avoir un effet pro oncogénique lorsqu'il est exprimé en dehors de son contexte physiologique.

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer le mode d'action et la régulation de l'expression ectopique de *CDX2*, notamment dans le système hématopoïétique. Il a été montré que la protéine CDX2 interagit avec le complexe KU70/80 dans les cellules intestinales afin d'inhiber la réparation non fidèle des cassures double brin de l'ADN de type NHEJ, expliquant en partie son rôle suppresseur de tumeurs dans l'intestin. Parallèlement à cela, l'interaction entre CDX2 et le complexe KU70/80 ne se produit pas dans les cellules leucémiques, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la dualité de fonction de *CDX2* dans l'intestin et le système hématopoïétique (Renouf et al. 2012).

Par ailleurs, l'inflammation est très souvent associée au processus de métaplasie. *CDX2* est une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription NF- κ B, régulateur clé de l'inflammation (Kim et al. 2002). Il a été montré que NF- κ B est probablement l'un des régulateurs de l'expression de *CDX2* dans l'œsophage de Barrett (Huo et al. 2017; O'Riordan et al. 2005). L'expression de *CDX2* est maintenue lorsque la métaplasie évolue en adénocarcinome, mais diminue lorsque la tumeur perd sa différenciation épithéliale (Moskaluk et al. 2003; Werling et al. 2003).

BMP4, membre de la superfamille des TGF β , a été identifié comme un inducteur possible de l'expression ectopique du gène *CDX2* dans les métaplasies intestinales de l'estomac. En effet, une étude réalisée sur des cellules AGS, une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome gastrique de type intestinal, montre que l'ajout de BMP4 augmente le niveau d'expression de *CDX2*. La protéine SMAD4 fait également partie de la voie du TGF- β régulant la croissance et la division cellulaire. L'inhibition du facteur SMAD4 induit une diminution de l'expression de *CDX2*. Ces observations suggèrent donc que BMP4 régule l'expression de *CDX2* via le transducteur de signal SMAD4 (Barros et al. 2008).

D'autres voies de signalisation peuvent induire l'expression ectopique de *CDX2*. C'est le cas de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque qui est impliquée dans le développement de l'œsophage de Barrett. Chang et al. ont montré que cette voie de signalisation induirait indirectement l'expression de *CDX2* par l'activation de la PI3Kinase, qui activerait le facteur NF- κ B et ainsi la transcription de *CDX2* (Chang et al. 2007). La protéine SHH est l'une des 3 protéines impliquée dans la voie de signalisation Hedgehog. SHH est diminuée dans les métaplasies intestinales de l'estomac, et associée à l'expression ectopique de *CDX2* au sein de ces mêmes métaplasies. La relation entre SHH et *CDX2* est soutenue par le phénotype des souris invalidées pour SHH qui présentent une différenciation intestinale dans l'épithélium gastrique (Ramalho-Santos et al. 2000).

Enfin, la méthylation du promoteur de *CDX2* est un phénomène observé dans les cancers colorectaux (Kawai et al. 2005). Des changements dans cette modification épigénétique sont également décrits dans les métaplasies intestinales de l'œsophage et de l'estomac. Dans l'estomac, Niu et al. ont montré une déméthylation significative du promoteur de *CDX2* dans des échantillons de métaplasies intestinales de l'estomac. Cette déméthylation serait favorisée par l'inhibition du facteur de transcription SOX2 (Niu et al. 2017). D'autres études ont mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de *CDX2* dans des adénocarcinomes œsophagiens et gastriques (Guo et al. 2007; Kameoka et al. 2015), ce qui est en corrélation avec la diminution d'expression de *CDX2* observée dans ces tumeurs. Il a également été montré que certains facteurs alimentaires (consommation de thé vert, légumes) et l'exposition chronique à l'acide biliaire peuvent induire la déméthylation du promoteur de *CDX2* dans l'œsophage et l'estomac et ainsi activer l'expression ectopique de *CDX2* (Marchetti et al. 2003; Yuasa et al. 2005). Enfin, une diminution du niveau d'expression de *CDX2* dans des lignées de cellules cancéreuses coliques a pu être associée à l'activation des voies Ras et PI3K (Lorentz et al. 1999 ; Kim et al. 2002).

OBJECTIFS

2. OBJECTIFS DE LA THESE

L'adénocarcinome pancréatique correspond à un problème de santé publique en raison de son incidence croissante et de son pronostic effroyable. La gravité de l'adénocarcinome pancréatique tient de son caractère silencieux à un stade localisé, de sa propension à développer des métastases, de l'absence de test de dépistage et de l'inefficacité des traitements existants. Par conséquent, les objectifs de la recherche en cancérologie pancréatique sont actuellement de permettre le diagnostic de la tumeur à un stade localisé accessible à une chirurgie d'exérèse et la mise au point de thérapies plus efficaces et innovantes dans le cadre d'une médecine personnalisée. Dans ce cadre, la connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorale ainsi que le développement de modèles précliniques appropriés de tumorigenèse pancréatique pour tester des approches thérapeutiques innovantes constituent deux enjeux majeurs de la recherche en cancérologie.

Dans ce contexte, l'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse s'intéresse à l'implication du facteur de transcription homéotique CDX2 dans la cancérogenèse pancréatique.

Plusieurs études ont mis en évidence une expression ectopique de CDX2 dans des lésions précancéreuses et dans des adénocarcinomes du pancréas chez l'homme, mais son rôle reste controversé : ainsi, Xiao et al. ont mis en évidence une expression de CDX2 dans environ un tiers des adénocarcinomes pancréatiques canaux et des lésions précurseurs PanIN et l'ont corrélée à une diminution significative de la survie globale (Xiao et al. 2014), tandis que Matsumoto et al. suggèrent que l'expression de CDX2 dans les adénocarcinomes du pancréas est associée à un meilleur pronostic (Matsumoto et al. 2004). Par ailleurs, il n'existait pas avant le début de ce projet de modèle murin d'expression ectopique de CDX2 dans cet organe.

Sur cette base, mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle de CDX2 dans la physiopathologie pancréatique et plus particulièrement dans la cancérogenèse pancréatique.

Deux objectifs principaux composent mon projet de thèse :

- Premièrement, chez l'homme, établir et caractériser l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique ainsi que son impact sur le pronostic de cette tumeur, par l'analyse d'une cohorte de patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques. Cette première partie comprend aussi une étude de l'expression de CDX2 dans des lésions précancéreuses pancréatiques.
- Deuxièmement, déterminer le rôle de CDX2 dans la cancérogenèse pancréatique, par l'étude des conséquences de l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas grâce à un modèle murin transgénique original développé au laboratoire.

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. Résumé des résultats obtenus

3.1.1. Caractérisation de l'expression de CDX2 dans le pancréas humain sain

Nous avons analysé le profil d'expression de CDX2 au sein de plusieurs échantillons de pancréas sain humain par immunohistochimie (n=78). Nous avons constaté un marquage nucléaire faible de CDX2 dans quelques cellules de l'épithélium canalaire et des cellules centro-acineuses dans le tissu pancréatique sain. Un marquage similaire est observé dans le pancréas du porc. En revanche CDX2 n'est pas exprimé dans le pancréas de la souris adulte. La différence d'expression au niveau du pancréas adulte est établie dès le stade embryonnaire, comme le montre l'analyse immunohistologique du primordium pancréatique d'un embryon humain de 56 jours et d'un embryon de souris de 12.5 jours. Enfin l'analyse de la structure primaire du transcrit a montré que la forme de CDX2 s'exprimant dans le pancréas humain est identique à la forme majeure exprimée dans l'intestin.

3.1.2. Caractérisation de l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique

Nous avons étudié le profil d'expression de CDX2 dans 78 échantillons humains d'adénocarcinomes pancréatiques par immunohistochimie. Il s'agissait de patients ayant eu une exérèse à visée curative pour un adénocarcinome excréto-pancréatique. Chez 46 patients (soit 59 %) on observait un marquage positif de CDX2 dans des cellules de l'adénocarcinome pancréatique et chez 32 (soit 41 %) d'entre eux, l'absence de marquage de CDX2. Certains échantillons étaient le siège de lésions précancéreuses telles que des PanIN de bas grade (44,9 %), PanIN de haut grade (60,3 %) et métaplasie acino-canalaire (16,7 %) dont respectivement 65,7 %, 59,6 % et 100 % expriment CDX2. L'analyse statistique a montré qu'il n'y a aucun lien entre l'âge, le sexe, la localisation de la tumeur, l'envahissement ganglionnaire, vasculaire

ou nerveux, le grade de différenciation, la présence de lésions pré-cancéreuses et l'expression de CDX2 au sein de l'adénocarcinome pancréatique.

3.1.3. Conséquence de l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique sur la survie des patients

Concernant l'impact de l'expression de CDX2 sur la SSR et la SG, nous avons pu montrer que le taux de récurrence globale était de 84,6 % (66/78). La médiane de SSR était de 9,9 mois chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique n'exprimant pas CDX2, inférieure à celle des patients ayant un adénocarcinome du pancréas exprimant CDX2 : 15 mois ($p = 0,11$). Concernant la SG, avec au terme de l'étude un taux de décès de 89,7 % (70/78), la médiane de SG était de 21,15 mois dans le groupe des patients ayant un adénocarcinome du pancréas n'exprimant pas CDX2, alors qu'elle était de 25,7 mois pour ceux ayant un adénocarcinome pancréatique exprimant CDX2. Cette différence numérique n'était cependant pas statistiquement significative sur la population étudiée ($p = 0,22$). Il est toutefois important de noter que 7 des 8 patients encore en vie au moment de la date de point présentaient une expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique.

Pour compléter ces données, nous avons étudié l'expression de PDX1, facteur de transcription homéotique ayant un rôle majeur dans le développement pancréatique. Nous avons observé qu'en cas de co-expression des facteurs de transcription CDX2 et PDX1 (CDX2+/PDX1+) dans la tumeur, à la fois la SG et la SSR étaient meilleures que chez les patients n'exprimant ni CDX2 ni PDX1 (CDX2-/PDX1-), respectivement de 20,8 versus 14,6 mois ($p = 0,18$) et de 15,2 versus 8,9 mois ($p = 0,027$).

3.1.4. Caractérisation de l'expression de CDX2 dans les TIPMP de type intestinal

Nous avons également étudié le profil d'expression de CDX2 dans des lésions précancéreuses, en particulier les tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas par immunohistochimie. Parmi les 70 échantillons de cette cohorte de TIPMP, 28 correspondaient à des TIPMP de type intestinal. Nous avons pu observer un marquage nucléaire de CDX2 dans les TIPMP de type intestinal de 26 patients (92,8 %). Les 28 TIPMP de type intestinal exprimaient MUC2. Une co-expression de PDX1 était mise en évidence dans 13 TIPMP de type intestinal (46,4 %).

3.1.5. Expression de Cdx2 au sein du modèle murin d'étude de la cancérogenèse pancréatique *Pdx1-Cre::Kras^{G12D}*

Aucune zone adénocarcinomateuse au sein du pancréas n'a été mise en évidence chez ces souris. L'analyse immunohistologique des souris *Pdx1-Cre::Kras^{G12D}* montre que la protéine Cdx2 est présente dans le pancréas des animaux, de manière hétérogène, au sein des zones de métaplasies acino-canalaires induites par KRAS (5/19). Cependant l'expression de Cdx2 n'est pas détectée dans le pancréas des animaux contrôles.

3.1.6. Caractérisation des lésions pancréatiques résultant de l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas du modèle *RsCDX2::AhCre^{ERT}*

Dans ce contexte, les conséquences physiopathologiques de l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas ont été analysées grâce au modèle murin inductible *RsCDX2::AhCre^{ERT}*. Il s'agit d'un modèle d'expression ectopique inductible de la protéine humaine CDX2 dans divers organes digestifs au stade adulte, dans les cellules exprimant la Cre recombinase. Ce modèle permet l'induction spatiale et temporelle de la recombinaison CreER^T qui excise les séquences entre deux sites LoxP. Pour générer les souris *RsCDX2*, un allèle recombinant comprenant la cassette d'expression conditionnelle de CDX2 insérée dans

le premier intron du locus Rosa26 a été construit (Grall et al. 2019). Cette cassette contient à son extrémité 5' un site accepteur d'épissage, un fragment excisable comprenant la séquence codante du gène de résistance à la Néomycine et un site de polyadénylation, le tout flanqué de deux sites LoxP, l'ADNc codant pour CDX2 humain et le site de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance (Figure 21). L'expression de la protéine de fusion CreER^T est sous le contrôle du promoteur du gène *CYP1A1*, activé par le xénobiotique lipophile β -naphthoflavone dans l'épithélium de plusieurs organes du tractus digestif : intestin, œsophage, estomac, pancréas, vésicule biliaire et foie (Ireland et al. 2004). Le β -naphthoflavone se lie aux récepteurs des aryl-hydrocarbures cytoplasmiques (Ah), ce qui induit leur translocation nucléaire et leur fixation aux éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) présents sur le promoteur du gène *CYP1A1*. Ceci permet la transcription de CreER^T. La protéine synthétisée s'accumule dans le cytoplasme. La recombinase Cre est liée au domaine de liaison au ligand (LBD) du récepteur des œstrogènes muté de la souris. Le tamoxifène, analogue synthétique des œstrogènes, est injecté aux souris et se lie au LBD. La protéine CreER^T est transférée dans le noyau et peut induire la recombinaison génétique entre deux séquences LoxP.

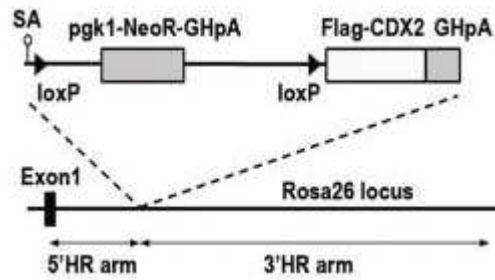


Figure 21 : Construction génétique des souris *RsCDX2*.

Le segment d'ADN inséré par recombinaison homologue dans l'intron 1 du gène *Rosa26* comprend un site accepteur d'épissage (SA), une cassette STOP de transcription flanquée de sites de recombinaison *LoxP* et incluant la séquence codante pour le gène de résistance à la Néomycine, la séquence d'ADNc codant pour la protéine CDX2 humaine fusionnée en 5' à une étiquette Flag et le site de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance (GHpA). La présence de la recombinaison *Cre* éliminera la région de la cassette située entre les 2 sites *LoxP*, conduisant à la synthèse d'un ARNm codant pour la protéine de fusion Flag-Cdx2 qui sera alors traduite. (Grall et al. 2019)

Contrairement à ce que nous avons observé chez l'homme et comme observé dans le modèle précédent, la protéine Cdx2 ne s'exprime pas dans les cellules acino-canaliaires du pancréas chez la souris contrôle. En revanche chez les souris *RsCDX2::AhCre^{ERT}* induisant une expression ectopique de CDX2, les résultats de l'immunomarquage montrent que la protéine CDX2 s'exprime de manière hétérogène au sein des cellules épithéliales acino-canaliaires. Dans le pancréas murin, l'expression ectopique de CDX2 déclenche un processus de type métaplasie acino-canalaire (19/29), correspondant à une involution canalaire des acini, sans évolution néoplasique. De plus, certaines modifications architecturales évoquent également les TIPMP de type intestinal observées chez l'homme et considérées comme des lésions précancéreuses (2/29). On observe la présence de cellules en gobelet ainsi que des plages de mucus au sein des structures canaliaires. Une expression de marqueurs de différenciation intestinale tels que Muc2, la phosphatase alcaline et villine est observée. On détecte également l'expression de marqueurs de cellules souches intestinales, *Olfm4* et *Msi1*, au sein de ces lésions. Au stade actuel, nous n'avons pas observé d'évolution cancéreuse chez les souris étudiées, même âgées (jusqu'à 18 mois) (n=29). L'analyse immunohistologique de ces lésions montre que la β -caténine est

exclusivement membranaire, ce qui n'est pas en faveur d'une activation de la voie Wnt/ β -caténine.

Afin de confirmer les résultats obtenus en immunohistochimie, l'expression relative de l'ARN messager de différents gènes (*CDX2*, *Muc2*, *Lyz2*, *Pdx1*) a été analysée par RT-qPCR dans le pancréas des souris *RsCDX2::AhCre^{ERT}*. Les résultats indiquent que le pancréas des souris *RsCDX2::AhCre^{ERT}* exprime le transgène *CDX2* humain. On constate également une expression 8 fois plus importante de la mucine *Muc2* par rapport aux souris contrôles.

3.1.7. Caractérisation des lésions pancréatiques résultant de l'expression ectopique de miniCDX2 dans le pancréas du modèle *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre*

Nous avons également étudié les conséquences fonctionnelles de l'expression ectopique de miniCDX2 dans le pancréas en utilisant le modèle d'expression ectopique inducible du variant d'épissage miniCDX2 dépourvu d'activité transcriptionnelle (souris *jojo-Flag-miniCDX2::VilCre*) (Balbinot et al. 2017). L'expression ectopique de miniCDX2 entraîne l'apparition d'une métaplasie acino-canalaire, cependant la pénétrance de ce phénotype est inférieure à celle du modèle *RsCDX2::AhCre^{ERT}* (seulement 40 % des animaux). On remarque également l'absence d'expression de marqueurs intestinaux. Il semble donc exister une dissociation de la fonction d'induction de la métaplasie acino-canalaire liée au domaine de liaison à l'ADN commun à *CDX2* et miniCDX2, et la fonction d'induction de la transdifférenciation intestinale requérant le domaine de transactivation de *CDX2*. De même que lorsqu'on exprime *CDX2* dans le pancréas murin, aucune évolution néoplasique n'a été observée dans le pancréas des souris exprimant miniCDX2 (n=20).

3.1.8. Etude de l'évolution des lésions dans un fond génétique $Apc^{+\Delta14}$

Puisque les lésions pancréatiques induites par l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas murin n'évoluent pas spontanément en cancer, nous avons étudié leur évolution en les plaçant dans un contexte de prédisposition génétique au cancer. Tout d'abord en affectant la voie Wnt/ β -caténine impliquée dans les cancers intestinaux, en utilisant les souris $Apc^{+\Delta14}$ qui développent spontanément des lésions tumorales dans l'intestin mais pas dans le pancréas. Nous avons néanmoins choisi de tester ce modèle chez la souris car, chez l'homme, le syndrome héréditaire de polypose adénomateuse familiale (individus $Apc^{+/-}$) s'accompagne d'une augmentation de 4,5 fois du risque d'adénocarcinome pancréatique. Pour cette étude, nous avons généré des souris $Apc^{+\Delta14}::RsCDX2::AhCre^{ERT}$. Pour cela, les souris $RsCDX2::AhCre^{ERT}$ ont été croisées avec des souris $Apc^{+\Delta14}$. Cependant, chez ces animaux, aucune évolution néoplasique n'a été observée au niveau du pancréas même à long terme (n=7).

3.1.9. Etude de l'évolution des lésions dans le contexte pro-tumoral de l'activation oncogénique de *KRAS*

Dans un deuxième temps, nous avons choisi d'affecter la voie RAS. Les adénocarcinomes pancréatiques chez l'homme se caractérisent par une fréquence importante de mutations activatrices de l'oncogène *KRAS*. L'induction de l'expression d'une forme oncogénique de *KRAS* dans le pancréas exocrine constitue un modèle expérimental de la tumorigenèse pancréatique chez la souris (Hingorani et al., 2003). Nous avons donc généré des souris $Rosa-G12D-Kras::RsCDX2::AhCre^{ERT}$ dans le but de déterminer si l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas exocrine accentue ou réduit le potentiel oncogénique de l'activation constitutive de la voie Ras. Chez ces animaux, aucune évolution néoplasique n'a pu être observée au niveau du pancréas (n = 4) à ce jour. Cependant, il est important de noter que ces animaux ont été sacrifiés rapidement après le traitement β NF+Tam (c'est-à-dire rapidement après l'induction conjointe de l'expression de CDX2 et de G12D-Kras) car la

présence de G12D-Kras induite dans l'estomac kératinisé des souris sous le contrôle du promoteur de *AhCre^{ERT}* entraîne le développement de papillomes occlusifs. De ce fait, il est possible que les souris n'aient pu être maintenues suffisamment longtemps en vie pour développer les lésions pancréatiques. Pour contourner ce problème, un nouveau modèle est en cours de développement.

3.2. Résultats complémentaires

Il s'agit de résultats obtenus au cours de la thèse, non décrits dans le manuscrit.

Parmi les 78 patients de notre cohorte, 15 patients correspondaient à des longs survivants, c'est-à-dire qu'ils étaient en vie 60 mois après l'exérèse chirurgicale de la tumeur pancréatique. Ces patients ont été opérés entre 2006 et 2011. Neuf patients avaient un marquage positif pour CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique (60 %). L'âge médian était de 65,5 ans. Les caractéristiques cliniques étaient comparables entre les 2 groupes. Dans cette cohorte, la présence d'une expression de CDX2 dans la tumeur se traduisant par une augmentation significative de la SG et de la SSR. La médiane de SSR était de 42,25 mois dans le groupe CDX2 négatif et n'était pas atteinte dans le groupe CDX2 positif ($p = 0,13$). La médiane de SG était de 71,75 mois dans le groupe CDX2 négatif et n'était pas atteinte en cas d'expression de CDX2 dans la tumeur ($p = 0,02$).

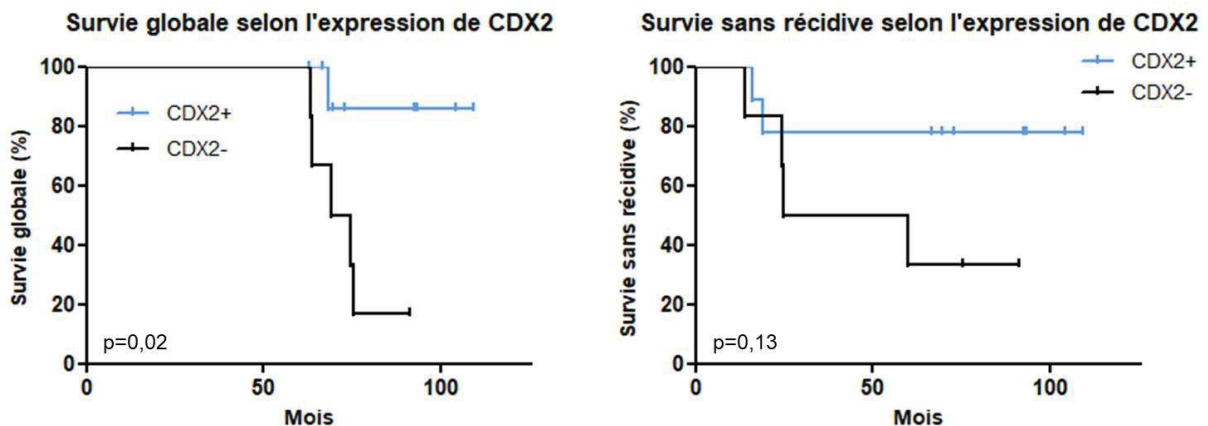


Figure 22 : Courbes de survie globale et survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique.

Les médianes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du log-rank.

Afin d'augmenter l'effectif de cette cohorte de patients longs survivants, nous avons réalisé cette même étude sur 39 patients opérés d'un adénocarcinome pancréatique à l'hôpital Beaujon, Paris. Ces patients ont été opérés entre 1997 et 2014. Parmi les 39 patients longs survivants de cette 2^{ème} cohorte, 30,8 % avaient un marquage pour CDX2 positif dans la tumeur (12/39). La médiane de SSR était de 101,67 mois dans le groupe CDX2 positif et n'avait pas été atteinte dans le groupe CDX2 négatif ($p = 0,05$). La médiane de SG n'était pas atteinte dans les deux groupes.

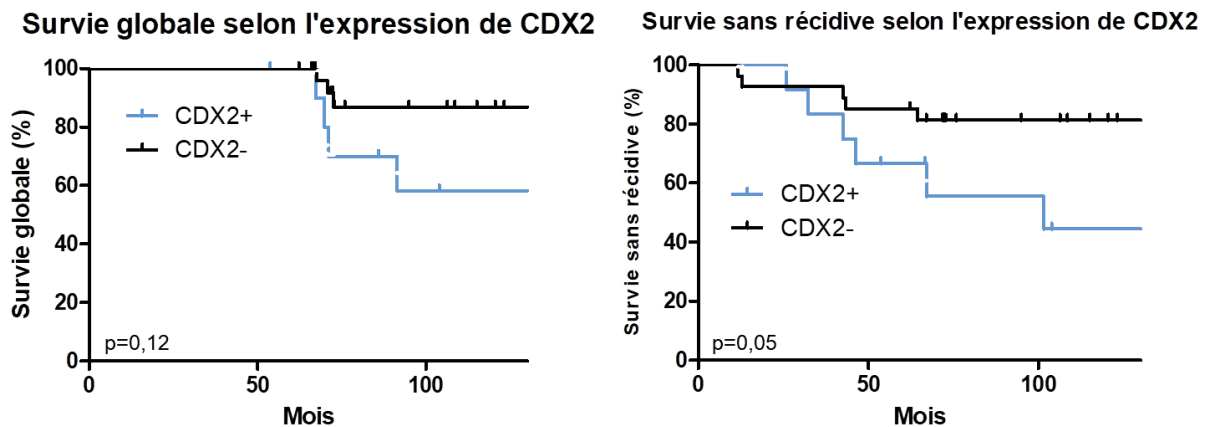


Figure 23 : Courbes de survie globale et survie sans récurrence selon l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique.

Les médianes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du log-rank.

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse a permis de mettre en évidence, par une approche combinant des études descriptives réalisées sur des échantillons humains d'adénocarcinome pancréatique et des études expérimentales menées chez la souris, l'implication de CDX2 dans la cancérogenèse pancréatique. Ces travaux établissent les bases pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse

pancréatique, prérequis essentiel pour une meilleure prise en charge thérapeutique du cancer du pancréas, en espérant ainsi en modifier son pronostic.

3.3. Publication

L'ensemble de ces résultats fait l'objet du manuscrit en cours de préparation :

Precancerous lesions induced by the CDX2 homeoprotein in the pancreas reveal separate functions of the DNA-binding and transactivation domains

**Bénédicte Caron^{1,2}, Gerlinde Averous², Asmaa Nair¹, Marie Vanier¹,
Nicolas Jonckheere³, Elisabeth Martin¹, Michela Plateroti¹, Vinciane Rebours⁴,
Jérôme Cros⁴, Philippe Bachellier^{1,2}, Manuela Tavian¹, Jean-Marie Reimund^{1,2},
Jean-Noël Freund^{1,*}, Isabelle Duluc¹**

¹ Université de Strasbourg, Inserm, IRFAC / UMR-S1113, ITI InnoVec, FMTS, 67200 Strasbourg, France

² Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Hôpital de Hautepierre), 67098 Strasbourg, France

³ Inserm UMR1277, CNRS UMR 9020, Université de Lille, 59000 Lille, France

⁴ ENETS Centre of Excellence, Hôpital Beaujon, Université de Paris, 92110 Clichy, France

Address for correspondence:

INSERM, UMR-S1113, ITFAC, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

jean-noel.freund@inserm.fr / +33 388 277727 / ORCID: [0000-0002-0971-3774](https://orcid.org/0000-0002-0971-3774)

Running title: Metaplastic function of *CDX2* in the pancreas

Conflict of Interest Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most frequent pancreatic tumour (McGuigan et al., 2018). Despite the improvement of diagnostic tools and the development of new chemotherapy protocols, surgical resection remains the only curative treatment. However, the majority of patients already present with locally advanced or metastatic pancreatic cancer at diagnosis, leading to a very poor prognosis with a 5-year survival rate of only ~7%. Different precursor lesions of PDAC have been described: acinar-to-ductal metaplasia (ADM), pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), mucinous cystic neoplasm (MCN) and intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) that subdivide into four major subtypes: oncocytic, gastric, pancreaticobiliary and intestinal (Basturk et al., 2015, 2015; Hruban et al., 2004). The intestinal subtype of IPMN corresponds to intestinal metaplasia expressing intestinal markers such as Mucin 2 (MUC2) and the transcription factor Caudal type homeobox 2 (CDX2) (Distler et al., 2014).

Intestinal metaplasia is a pathological condition described mainly in the stomach and oesophagus (Barrett oesophagus) as well as in other epithelial organs of endodermal origin like the gallbladder and bile ducts, lung, nasal mucosa, bladder and pancreas. It corresponds to a partial or complete transformation of the normal epithelium into an intestinal-type epithelium, and is generally considered as a precancerous lesion on the basis of its association with adenocarcinomatous areas in a significant proportion of gastric and oesophageal cancers (Mosnier, 2012).

The homeotic transcription factor CDX2 is the primary determinant of intestinal identity during gut embryogenesis and a major regulator of epithelial homeostasis in the adult intestine (Gao et al., 2009; Stringer et al., 2012; Verzi et al., 2011). Consistent studies have reported a decreased or heterogeneous expression of CDX2 correlating with an adverse prognosis in

human colon cancers (Baba et al., 2009; Balbinot et al., 2018; Brabletz et al., 2004; Dalerba et al., 2016; Pilati et al., 2017), and associated with an enhanced propensity to develop tumors in mouse models of intestinal cancers (Aoki et al., 2003; Balbinot et al., 2018; Bonhomme et al., 2003; Hryniuk et al., 2014; Sakamoto et al., 2017). This led to attribute a tumor suppressor activity to this homeobox gene in the gut. However, an overexpression of CDX2 has also been reported in few colon cancers, associated with small genome amplifications of the CDX2 locus, and in this case this homeobox gene behaves as an oncogene (Salari et al., 2012).

Although CDX2 is generally considered as an intestine-specific gene, a physiological expression also occurs at a low level in centroacinar cells and in some ductal cells of the human exocrine pancreas (Xiao et al., 2014). Moreover, an abnormal expression has been reported in a number of PDACs, associated either with a better or a worse prognosis (Matsumoto et al., 2004; Xiao et al., 2014). On this basis, the goal of this study was to evaluate the relevance of CDX2 in PDACs and to study its impact on the pathological sequence using mouse models of gain of function.

Material and Methods

Patients and pathological examination

Patients eligible for this study were 18 year-old or older with histologically confirmed PDAC, having undergone a curative-intended surgery (R0 or R1) between January 1st, 2006 and December 31th, 2011 followed by adjuvant chemotherapy by Gemcitabine. Inclusion criteria were R0 or R1 resection, a tumor classified from T1 to T3 according to the TNM classification of the AJCC (American Joint Committee on Cancer) and the presence or not of a nodal invasion. Exclusion criteria were neoadjuvant chemotherapy, diagnosis of metastases during the surgery, R2 resection, concomitant neoplasia, adjuvant chemotherapy other than Gemcitabine, no adjuvant chemotherapy and diagnosis of metastases prior to the onset of chemotherapy. The collected data were: age, sex, tumor localization, nodal, vascular or nerve invasion, differentiation grade and presence of precancerous lesions. The recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS) were calculated from the date of surgery. The date of recurrence was the date of the first imaging examination showing recurrence of the disease. Tissue samples were provided by the tumor tissue collection of the Strasbourg University Hospital with the written consent of the patients for the use of the samples for research purposes. Pathological evaluation of the tumor samples was performed in blind by a pathologist of the Pathology Department of the Strasbourg University Hospital.

Human embryos were obtained from voluntary abortions performed according to guidelines and with the approval of the French National Ethics Committee.

Mice

RsCDX2 (Grall et al., 2019), *jojo-miniCDX2* (Balbinot et al., 2017), *Apc^{+/-Δ14}* (Colnot et al., 2004), *AhCre^{ERT}* (Ireland et al., 2005), *VilCre* (El Marjou et al., 2004) and *Rosa-LSL-KRas^{G12D}* (Johnson et al., 2001) mice have been described. They were genotyped by PCR on

tail DNA with the following primers: *RsCDX2* GTGGTTTGTCCAAACTCATCA / CACGTGGTAACCGCCGTAGTC; *jojo-Flag-miniCDX2* AGTCATAGCTGTCCCTCTTC / TCAGCCTGGAATTGCTCTGC; *Apc^{+Δ14}* CTGTTCTGCAGTATGTTATCA / TATAAGGGCTAACAGTCAATA; *AhCre^{ERT}* GCCTGGTCTGGACACAGTCC / GGTTCAGCATCCAACAAGGC; *VilCre* CAAGCCTGGCTCGACGGCC / CGCGAACATCTTCAGGTTCT; *Rosa-LSL-KRas^{G12D}* GGGTAGGTGTTGGGATAGCTGTGCGACAAGC / CCTTTACAAGCGCACGCAGACTGTAGAGC.

For this study, control animals were wild-type, *RsCDX2*, *AhCre^{ERT}*, *jojo-miniCDX2* and/or *VilCre* littermates. Mice experiments were performed in the certified animal facility (number H-67-482-21) according to the protocol approved by the French Ministry of Agriculture under the permits APAFiS #833 and #21684. For conditional expression of CDX2, miniCDX2 and/or KRas^{G12D} under the *AhCre^{ERT}* allele, 6-8 weeks adults received intraperitoneal injections of 1.6 mg βNF+TAM (Sigma-Aldrich) in corn oil, once daily for 4 days.

RNA preparation and analysis by RT-PCR

RNA was extracted from human and mouse pancreas with Tri Reagent (Euromedex) and the quality was analyzed using nanoRNA chips on a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed with 2 μg RNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Invitrogen) and Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen). After reverse transcription, the sequence of the human *CDX2* transcript expressed in the pancreas was determined by PCR amplification and sequencing using combinations of forward (GGCAGCCTTCAACGTCGGTC; CTGCGCTTCTGGGCTGCTGC; GGAGCTGGAGAAGGAGTTTC) and reverse primers (CAGGAGGGCCGGGGTTGAGC; CTCTGCGGTTCTGAAACC; GGCTCAGCCTGGAATTGCTC). In the mouse pancreas,

quantification of the endogenous *Cdx2* transcripts and of the transcripts of the *CDX2* transgene was performed by qPCR using 1/10th of the RT solution with the TaqMan Master Mix and gene-specific TaqMan primers sets (TaqMan Gene Expression assays, Life Technologies Applied Biosystems): mouse *Cdx2*, Mm01212280_m1; human *CDX2*, Hs00230919_m1, and mouse *Tbp*, Mm00446973_m1. Analysis of the results obtained in triplicate was performed with the 7500 soft-ware v2.0.1 (Life Technologies Applied Biosystems) using the relative $\Delta\Delta C_t$ quantification method.

Immunohistology

Immunohistochemistry and immunofluorescence detection were performed on tissue samples fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, as described previously (Balbinot et al., 2018). Primary antibodies were as follows: mouse anti- α -smooth-muscle actin (Biorad, MCA5781GA, dilution 1:500), mouse anti- β -catenin (BD Transduction Lab, clone 14, dilution 1:500); mouse anti-*Cdx2* (Biogenex, CDX2-88, F/MU392A-UC, dilution 1:500), rabbit anti-*Cdx2* (Thermo Fisher Scientific, EPR2764Y, ab76541; dilution 1:10,000), rabbit anti-Claudin18 (Invitrogen, 38-8000, dilution 1:500), rabbit anti-Iba1 (Biorbyt, orb10863; dilution 1:500), rat anti-Krt19 (DSHB, Troma-III AB2133570, dilution 1:250), rabbit anti-Hes1 (Cell Signaling, #11988, dilution 1/5000), mouse anti-HNF4 α isoforms 1-6 (RD System, PP-K9218-00, dilution 1:2000), mouse anti-HNF4 α isoforms 7-9 (RD System, PP-H6939-00, dilution 1:500), rabbit anti-Ki67 (Thermo Fisher Scientific, RM9106-S; dilution 1:500), rabbit anti-miniCDX2 (Balbinot et al., 2017) at 15 μ g/ml, mouse anti-Mist1 (Invitrogen, MAI-517, dilution 1:250), rabbit anti-Msi1 (Millipore, AB5977, dilution 1:250), rabbit anti-Muc2 (Santa Cruz Biotechnology, H-300, sc-15334, dilution 1:1,000), mouse anti-Muc5ac (Novocastra, NCL-MUC-5AC, dilution 1:100), rabbit anti-mouse-Olfm4 (Cell Signaling Technology, D6Y5A, dilution 1:500), rabbit anti-human-PDX1 (Abcam, #134150 dilution, 1:1000); mouse

anti-mouse-Pdx1 (Abcam, ab47267, dilution 1:1000), mouse anti-Sox2 (R&D System; MAB2018, dilution 1:500), anti-Sox9 (Millipore, ab5535, 1:1000), rabbit anti-p-STAT3 (GenTex GTX61820, dilution 1:500), rabbit anti-Taz (Sigma, WWTR1, HPA007415, dilution 1:500), goat anti-Villin (Santa Cruz Lab, C-19, sc-7672, dilution 1:500), goat anti-Yap (Abcam, Trim29, ab99486, dilution 1:1000). Immunohistochemistry used secondary biotinylated antibodies (Vector Laboratories, dilution 1:200) revealed with the ABC kit (Vector Laboratories) as recommended by the supplier. Immunofluorescence detection used secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488 or with Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, dilution 1:1,000). Visualization was performed using an Axio Zoom.V16 microscope, an Axiophot microscope, or an Axio Imager Z2 microscope (Zeiss).

Statistical analysis

Qualitative variables were compared with the Fisher's test. The Kaplan Meier method was used to estimate OS and RFS. The statistical comparison for survival was performed by the log-rank test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Moderate impact of the CDX2 status on the evolution of human pancreatic adenocarcinoma

Immunohistochemistry revealed CDX2 protein expression in the healthy human pancreas at the level of centroacinar and ductal cells, yet much weaker than in its major site of expression, the gut epithelium (Figure 1A). Centroacinar and ductal cells together with Langerhans islet cells also expressed PDX1, a key transcription factor of pancreas development (Figure 1A). The same expression pattern was observed in pigs (Figure 1B) but not in mice which failed expressing the Cdx2 protein in the adult pancreas (Figure 1C). The adult pattern reflects the pattern established during embryonic development, as illustrated by the presence of CDX2 protein in a limited number of cells of the pancreatic primordium of a 56-day human embryo (Figure 1D) whereas the protein is absent in E12.5 mouse embryos (Figure 1E).

Since the *CDX2* gene can generate several splicing variants encoding truncated forms of the protein (Balbinot et al., 2017; Witek et al., 2014), we have analyzed the primary structure of the human pancreatic transcript by RT-PCR using combinations of primers to overlap the open reading frame. The determination of the sequence of the amplicons, especially the splicing junctions, demonstrated the expression of the full-length form of the CDX2 protein in the pancreas, comprising the transcription activation domain at its amino side, the central DNA-binding homeodomain and the regulatory carboxy domain.

Next, the expression of CDX2 was analyzed by immunohistochemistry in a series of 78 patients with PDAC who had undergone curative surgery followed by adjuvant chemotherapy with Gemcitabine. The clinical and pathologic characteristics of the tumors are summarized in the Supplementary Table 1. Overall, the CDX2 protein was detected in 46/78 (59%) of this PDAC series (Figure 2A, Supplementary Table 1). Age, sex, tumor localization, nodal, vascular or nerve invasion, differentiation grade and presence of precancerous lesions were not different between CDX2-positive (CDX2^{pos}) and CDX2-negative (CDX2^{neg}) patients. Among the 46

CDX2^{pos} samples, 10 showed positive staining for MUC2, a typical intestinal mucin regulated by CDX2 in the gut but absent in all but one of the 32 CDX2^{neg} PDACs. Immunostaining of serial sections also revealed 54 (74.4%) of the PDACs expressing PDX1, with 41 (52.6%) of them exhibiting tumor tissue positive for both CDX2 and PDX1, whereas both proteins remained undetectable in 15 cases (19.2%) (Figure 2A).

The median duration of follow up of the 78 patients was 21.6 months (95% Confidence Interval (CI): 3.9-143.9) (Figure 2B) and the analysis of RFS was based on 66 events occurring in 78 patients (84.6%). The median RFS was slightly higher for CDX2^{pos} (15 months; 95% CI: 1.5-143.9) compared to CDX2^{neg} patients (9.9 months; 95% CI: 3.7-137.8) but the difference was not statistically significant. The OS analysis was based on 70 deaths among the 78 patients of the cohort (89.7%). Again, the median OS was slightly but not significantly higher in CDX2^{pos} patients (25.7 months; 95% CI: 3.9-117.8) than in CDX2^{neg} patients (21.15 months; 95% CI: 5-75.1). PDX1 expression alone had no impact on RFS and OS. However, patients with both CDX2^{pos}+PDX1^{pos} PDAC had a higher RFS (15.2 versus 8.9 months) and OS (20.8 versus 14.6 months) than CDX2^{neg}+PDX1^{neg} patients, with a significant difference for the RFS ($p=0.027$). Altogether, these results suggest that the presence of CDX2 has only a moderate effect on PDACs. Nevertheless, among the 8 patients still alive at the endpoint date, 7 had CDX2 expression in their pancreatic adenocarcinoma.

CDX2 expression in intraductal papillary mucinous neoplasm with intestinal-type differentiation

Along with the PDACs in the series of 78 patients, histological examination displayed precursor lesions, among which ADMs in 13 (16.7%) samples, low grade and high grade PanINs in respectively 35 (44.9%) and 47 (60.3%) cases, and 1 IPMN (Supplementary Table 1). The

presence of CDX2 significantly correlated among PDACs and the associated high grade PanINs ($p=0.017$). The single IPMN was of intestinal-type and expressed both CDX2 and PDX1.

To strengthen these results with a special focus on IPMNs, we analyzed a series of 70 of such lesions of which 3 were histologically characterized as gastric-type, 7 pancreatobiliary-type, 28 intestinal-type and 32 undefined (Figure 2C). All but 2 of the intestinal type IPMNs expressed the CDX2 protein as well as 1 undefined, 1 gastric-type and 1 pancreatobiliary IPMN in which the expression was limited to less than 1% of the cells. None of the other lesions did express CDX2. PDX1 was co-expressed with CDX2 in 13 intestinal-type IPMNs, in 1 undefined and 1 gastric-type lesion with limited CDX2 expression, and also in 3 pancreatobiliary-type and 4 undefined IPMNs devoid of CDX2. All the 28 intestinal-type IPMNs expressed MUC2, as well as the 1 gastric-type, 1 pancreatobiliary and 6 undefined lesions.

These results highlight the strong correlation between CDX2 expression and precancerous intestinal-type IPMNs, half of them also expressing PDX1.

Ductal lesions triggered by the ectopic expression of CDX2 in the mouse pancreas

The human data prompted us to investigate the functional relationship between the expression of CDX2 in pancreatic lesions and the development of these lesions, using mice as model. Firstly we analyzed this gene in a standard transgenic model generating precursor lesions of pancreatic adenocarcinoma, the *Pdx1Cre::Rosa-LSL-KRAS^{G12D}* mice (Hingorani et al., 2004). Although the *Cdx2* gene is not active in the normal mouse pancreas, unlike in human (see Figure 1), the *Cdx2* protein, though, was detected by immunostaining in lesions developing in 5 of the 19 *Pdx1Cre::Rosa-LSL-KRAS^{G12D}* mice analyzed here (Figure 3A). Even if this event was infrequent, it nevertheless demonstrated the capability of the *Cdx2* homeobox gene to be abnormally turned on in the murine pancreas in a pro-oncogenic context. Treating the *Pdx1Cre::Rosa-LSL-KRAS^{G12D}* mice with Caerulein, known to worsens the *KRAS^{G12D}*-induced

pancreatic lesions (Morris et al., 2010), did not increase the level of expression of Cdx2 (not shown).

On this basis, we addressed whether the abnormal expression of this homeobox gene could itself contribute to the development of precursor cancer lesions and/or overt cancers in the mouse pancreas. For this purpose, we generated *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice to induce the expression of the human CDX2 protein in the exocrine pancreas by Cre activation following β NF+TAM administration in adult animals. As soon as the day after the end of β NF+TAM treatment, immunostaining revealed a mosaic pattern of the protein expressed in acinar cells and also in few duct cells but not in the endocrine pancreas (Figure 3B). The expression of the transgene was maintained in the long term, as shown by RTqPCR (Figure 3C), yet without evidence of any gross lesion at the histological level during the first 1-2 months after β NF+TAM administration. Then, lesions appeared after 3-4 months in 2/3rd of the mice (n=19/29). Histologically, they corresponded to overgrowing ductal lesions with figures of metaplastic transformation of acini into ducts associated with the presence of immune cells indicating an inflammatory process. Some lesions exhibited goblet-like cells reminiscent of human intestine-type IPMNs. Most of the lesions expressed the CDX2 protein and also a high level of Pdx1 (Figure 3D). In a number of cases, ducts overgrowth was accompanied by large areas of the exocrine pancreas being replaced by fat tissue, whereas the islets of Langerhans were preserved. The adipocytes were negative for CDX2, indicating that they did not originate from the transdifferentiation of CDX2-expressing duct or acinar cells. The lesions present in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice did not compromise the lifespan of the mice which could survive over 18 months. Importantly, these lesions failed to spontaneously evolve into overt cancer even in the oldest animals.

As illustrated in Figure 4, the ductal lesions developing in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice exhibited numerous proliferative Ki67-positive cells in comparison with the infrequent cycling cells in

the wild type pancreas. They also showed a broad expression of Krt19 and membranous β -catenin. Mist1, an important regulator of acinar cells differentiation, was absent in both wild type ducts and metaplastic lesions, in contrast to Sox9 already present in the wild type ducts but increased in the lesions. Beyond this general pattern, the lesions erratically turned on several transcription factors and differentiation markers. Indeed, a number of metaplastic ducts showed the onset of expression of the Notch pathway factor Hes1, which together with Sox9 and Pdx1 form a regulatory core involved in early pancreatic development and ducts formation in the embryo (Kopp et al., 2011; Yin, 2017). Since Sox9 and Hes1 also represent components of the intestinal stem cell signature (Muñoz et al., 2012), we look for two other elements of this signature, Olfm4 and Msi1. They were likewise ectopically turned on in several ductal lesions. On this basis, while considering the primary role played by Cdx2 in the determination of the intestinal fate (Gao et al., 2009; Stringer et al., 2012; Verzi et al., 2011), we analyzed intestinal differentiation markers. It revealed the ectopic expression of Alkaline Phosphatase activity and Villin as well as the presence of scattered cells stained by Alcian blue and expressing Muc2, indicating that CDX2 induced the differentiation of cells representative of both absorptive and secretory intestinal lineages. HNF4 α contributes to the dynamic homeostasis of the gut epithelium, the isoforms 7-9 and 1-6 being preferentially found in the proliferative and differentiated compartments, respectively. Both types of HNF4 α isoforms were hardly detected in the normal exocrine pancreas. However, they were expressed in the lesions of *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice, the isoforms 1-6 being prevalent compared to the sporadic expression of the isoforms 7-9. Therefore, these data indicate that the ectopic expression of CDX2 in the adult exocrine pancreas induces an inflammatory process that generates ADMs; these lesions express components of the regulatory core at work during pancreatic ducts formation in the embryo, together with factors of the intestinal stem/progenitor compartment,

ultimately leading to the ectopic expression of typical differentiation markers shared with the gut epithelium.

Separating the functions of duct overgrowth and intestinal-type differentiation within the domains of the CDX2 protein

While the majority but not all the ADMs developing in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice exhibited intestinal transcription factors and differentiation markers, it opened the possibility that duct overgrowth and intestinal differentiation might be related but distinct events. To address this question, we took advantage of the *VilCre::jojo-miniCDX2* transgenic mice designed to express the splicing variant miniCDX2 overlapping the DNA-binding homeodomain of the full-length CDX2 protein but devoid of its transcription activation domain (Balbinot et al., 2017). These mice expressed miniCDX2 not only in the intestinal Brunner's glands, as previously reported (Balbinot et al., 2017), but also in the exocrine pancreas (Figure 5). Noteworthy, like the *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice, nearly half of the *VilCre::jojo-miniCDX2* mice (n=9/20) showed ADMs associated with the expression of the miniCDX2 homeoprotein (Figure 5). These lesions were characterized by high levels of Pdx1 and Sox9, a broad expression of Krt19 and membranous β -catenin, and also an increased number of Ki67-labeled proliferating cells. Some lesions expressed the intestinal stem cell signature factors Olfm4, Msi1, and erratically Hes1. However, in contrast to CDX2, the lesions developing in miniCDX2-expressing mice neither displayed Alkaline Phosphatase activity, nor Villin and Muc2 proteins, nor Alcian blue staining. In addition, the isoforms 1-6 and 7-9 of HNF4 α could not be detected. Moreover, in line with the absence of intestine-type differentiation markers, the endogenous *Cdx2* gene remained unexpressed in the lesions induced by miniCDX2 (Figure 5).

Given that the ADMs of *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice differ in their differentiation potential, and that human precancerous lesions, mainly IPMNs, can follow

various differentiation paths, we analyzed gastric markers in the pancreatic lesions of mice ectopically expressing either miniCDX2 or CDX2 (Figure 6). Strikingly, Muc5ac and more sporadically Claudin18 were expressed in ADMs of the *VilCre::jojo-miniCDX2* mice, whereas both proteins were absent in control mice. Corroborating this observation, the lesions in *VilCre::jojo-miniCDX2* mice also turned on Sox2, an important transcription factor involved in foregut / gastric development. However, in clear contrast with the *VilCre::jojo-miniCDX2* mice, the *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice did neither express Muc5ac, nor Claudin18 nor Sox2.

Altogether, these results demonstrate on the one hand that the DNA-binding domain in common between the CDX2 and miniCDX2 homeoproteins is sufficient to drive the formation of ADMs, and on the other hand that the intestine-type differentiation of the lining epithelium additionally requires the transcriptional domain whereas in the absence of this domain the ADMs adopt a default foregut/gastric-type differentiation.

Cellular and molecular events associated with the development of the lesions

Next, we analyzed cellular and molecular properties associated with the formation of CDX2- and miniCDX2-driven ADMs, based on what has been described for the emergence of precancerous lesions induced by injury in the mouse pancreas (Storz and Crawford, 2020) (Figure 7). In both *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice, the microenvironment of the lesions was modified toward a pro-inflammatory fate, as evidenced by the recruitment of macrophages (Iba1^{POS}) and by the activation of stellate cells into myofibroblasts (α SMA^{POS}). Facing this activated microenvironment, the lining epithelium of ADMs showed the expansion of DCLK1-expressing progenitor cells. Moreover, Jak/Stat signaling was activated in many epithelial (phospho-STAT3), and the Yap and Taz proteins were strongly accumulating in cell nuclei, predominantly in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice, indicating the activation of the Hippo pathway. Altogether, these data highlight the similarities

existing between ADMs resulting from the ectopic expression of CDX2 or miniCDX2 in the pancreas and those induced by injury, while the acquisition of the intestine-type differentiation of the epithelium lining these lesions is further driven by the intestinalizing activity of CDX2.

Evolution of the CDX2- and miniCDX2-induced pancreatic lesions in pro-oncogenic context

As the lesions developing in the pancreas of *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice did not spontaneously progress into overt cancers, we investigated their fate in a pro-oncogenic context. While the impact of Familial Adenomatous Polyposis on (FAP) pancreatic cancer is still controversial (Pittman et al., 2016), the intestinal-type differentiation of the pancreatic lesions developing in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice while FAP predominantly affects the gut, prompted us to investigate if these lesions could evolve into overt cancer in the tumor-prone context of *Apc* heterozygosity. For this purpose, we generated *AhCre^{ERT}::RsCDX2::Apc^{+/ Δ 14}* mice and also *VilCre::jojo-miniCDX2::Apc^{+/ Δ 14}* mice. No malignant evolution was observed in respectively 7 and 7 of these recombinant mice. Moreover, the histology of the pancreas was less altered in *AhCre^{ERT}::RsCDX2::Apc^{+/ Δ 14}* than in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice since lesions were only found in 28.6% (2/7) of the former animals compared to 65.5% (19/29) of the latter.; the same observation was made for *VilCre::jojo-Flag-miniCDX2::Apc^{+/ Δ 14}* vs *VilCre::jojo-miniCDX2* mice . Thus, instead of the oncogenic effect played by β -catenin in the gut epithelium upon loss of *Apc*, this observation could reflect the gatekeeper role of β -catenin, under looser control in the *Apc^{+/ Δ 14}* context, against ADM formation (Morris et al., 2010).

We next moved to the model of induction of activated KRas^{G12D}. For this purpose, we first aimed at using *AhCre^{ERT}* mice to induce KRas^{G12D} expression but these could not be retained because *AhCre^{ERT}::KRas^{G12D}* mice develop obstructive papilloma in the keratinized stomach that compromise long-term survival. To overcome this problem, we are generating mice models

that induce ectopic expression of CDX2 and miniCDX2 specifically in the exocrine pancreas but not in the stomach.

Discussion

The aim of this single center retrospective study was to analyze the expression profile of CDX2 and its impact on OS and RFS in 78 patients who underwent a curative intent surgery for pancreatic adenocarcinoma and received adjuvant chemotherapy by Gemcitabine. In our study, two groups of patients could be defined according to their CDX2 expression (positive or negative) in pancreatic tumor cells. CDX2 expression in PDA did not differ according to sex, type of surgery, vascular, ganglionic or nervous invasion, grade of differentiation or presence of precursors lesions of PDA. These results have to be confirmed as several data are incomplete for some patients. This can be partly explained by the retrospective nature of this work.

Our results show that CDX2 expression in PDA is associated to a better RFS and OS. The differences were not statistically significant, but the few patients still alive at the point date belonged to the CDX2-positive group. This lack of statistical significance could be related to a lack of power of the study. It is possible that by increasing the patients' number, CDX2 expression may also appear as a significant factor of better prognosis. These results are consistent with the work of Matsumoto et al. Their study included 30 patients undergoing surgery for PDA and suggested that CDX2 expression was associated with a better prognosis ($p=0.015$) (Matsumoto et al. 2004). By contrast, our results differ from those of Xiao et al. relating a significant decrease in OS when CDX2 was expressed in tumors (308 days versus 586 days, $p<0.001$) (Xiao et al. 2014). This difference may be related to the fact that in their study, an expression of CDX2 was considered negative if it concerned less than 1% of tumor cells. In our study, when CDX2 IHC expression was below 1% of the tumors cells, it was considered positive.

All of these data suggest that the ectopic expression of CDX2 in PDA could provide a moderate benefit on survival in pancreatic cancer.

The study of the functional consequences of the ectopic expression of CDX2 in the pancreas, using the murine model *AhCre^{ERT}::RsCDX2*, provided interesting results. In the exocrine pancreatic tissue, ectopic CDX2 expression leads to ADM formation. The ectopic CDX2 expression induces the activation of one of its target genes the intestinal mucin Muc2. The architectural modifications are in favor of CDX2-induced intestinal metaplasia. However ectopic CDX2 expression does not appear to be sufficient to confer complete intestinal identity to the pancreatic ductal epithelium. Indeed, we did not observe architectural modifications such as villus or crypts, and the four cell intestinal types are not all present. The ability of CDX2 to confer intestinal identity therefore seems to depend on the cellular context.

The expression of CDX2 in the pancreatic ductal epithelium of mice seems to be associated with the expression of Pdx1, Sox9 and Hes1, involved in pancreatic development and ducts formation, in the ADM. The hypothesis might be that their expression is induced to maintain pancreatic identity in metaplastic cells of the exocrine pancreas.

These results open us many perspectives on physiopathology. The results obtained in the *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice showed the development of an inflammatory process generates ADM in the pancreas. This could be accompanied by incomplete intestinal metaplasia. For humans, the classification of precursor lesions of PDA considers ADM as a precursor lesion but this has not been demonstrated experimentally. It is observed in the chronic pancreatitis but also for patients with a family history of pancreatic cancer. However, the molecular sequence of this lesion is not completely known. Our model could make possible to characterize it. This pancreatic phenotype with the presence of mucus-producing cells within the ADM recalls the intestinal type of IPMN characterized by the expression of CDX2 and mucin MUC2. However, we did not observe any cancer. This fact indicates that these lesions do not evolve naturally into cancer in mice, or that the limited life of the mouse prevents the malignant evolution of these lesions.

The *VilCre::jojo-miniCDX2* transgenic mice express the splicing variant miniCDX2 corresponding to the DNA-binding homeodomain of the full-length CDX2 protein but devoid of its transcription activation domain (Balbinot et al. 2017). Nearly half of these mice developed ADM associated with the expression of the miniCDX2 homeoprotein. But they didn't develop intestinal-like differentiation. This result demonstrates a dissociation of the function of inducing ADM (by the DNA binding domain common to CDX2 and miniCDX2) and the function of inducing intestinal differentiation (which requires the CDX2 transactivation domain).

In pro-oncogenic context (Apc heterozygosity or activated KRasG12D), *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice didn't develop pancreatic cancer. This can be explained by the early death of mice, due to the development of occlusive tumors in the stomach of *AhCre^{ERT}::KRas^{G12D}* mice. To overcome this problem, we need a mice model that induces ectopic expression of CDX2 specifically in the exocrine pancreas.

In conclusion, these results suggest that the expression of CDX2 in pancreatic cancer is associated with a better prognosis. This study may increase our understanding of the mechanisms involved in pancreatic carcinogenesis with the development of a mice model of gain of function reproducing precursor lesions of PDAC like ADM and intestinal subtype of IPMN. The development of models of pancreatic cancer progression is necessary. A better understanding of pancreatic cancer development and progression may lead to more effective diagnostic and therapeutic strategies.

References

- Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc(+/-Delta716) Cdx2(+/-)* compound mutant mice. *Nat.Genet.* *35*, 323–330.
- Baba, Y., Noshō, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., Meyerhardt, J.A., Hornick, J.L., Shivdasani, R.A., Fuchs, C.S., et al. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* *15*, 4665–4673.
- Balbinot, C., Vanier, M., Armant, O., Nair, A., Penichon, J., Soret, C., Martin, E., Saandi, T., Reimund, J.-M., Deschamps, J., et al. (2017). Fine-tuning and autoregulation of the intestinal determinant and tumor suppressor homeobox gene CDX2 by alternative splicing. *Cell Death Differ.* *24*, 2173–2186.
- Balbinot, C., Armant, O., Elarouci, N., Marisa, L., Martin, E., De Clara, E., Onea, A., Deschamps, J., Beck, F., Freund, J.-N., et al. (2018). The *Cdx2* homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms. *J. Exp. Med.* *215*, 911–926.
- Basturk, O., Hong S.M., Wood L.D., Adsay N.V., Albores-Saavedra J., Biankin A.V., Brosens L.A., et al. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 1730–41.
- Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M.P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J.N., and Domon-Dell, C. (2003). The *Cdx2* homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* *52*, 1465–1471.
- Brabletz, T., Spaderna, S., Kolb, J., Hlubek, F., Faller, G., Bruns, C.J., Jung, A., Nentwich, J., Duluc, I., Domon-Dell, C., et al. (2004). Down-regulation of the homeodomain factor *Cdx2* in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res* *64*, 6973–6977.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest* *84*, 1619–1630.
- Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P.S., Miranda, S.P., et al. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* *374*, 211–222.
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., and Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int* *2014*, 474905.
- El Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* *39*, 186–193.
- Gao, N., White, P., and Kaestner, K.H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by *Cdx2*. *Dev. Cell* *16*, 588–599.
- Grall, E., Gourain, V., Nair, A., Martin, E., Birling, M.-C., Freund, J.-N., and Duluc, I. (2019). Severe head dysgenesis resulting from imbalance between anterior and posterior ontogenetic programs. *Cell Death Dis* *10*, 812.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2004). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* *5*, 103.

- Hruban, R., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., et al. (2004). An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28, 977-87.
- Hryniuk, A., Grainger S., Savory J.G., et Lohnes D. (2014). Cdx1 and Cdx2 Function as Tumor Suppressors. *J. Biol. Chem.* 289, 33343-54.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., and Winton, D.J. (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev.Dyn.* 233, 1332–1336.
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., and Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410, 1111–1116.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., and Sander, M. (2011). Sox9⁺ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* 138, 653–665.
- Matsumoto, K., Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Ogasawara, N., Hirata, A., Shimizu, Y., Haneda, M., Yamao, K., and Tatematsu, M. (2004). Cdx2 expression in pancreatic tumors: Relationship with prognosis of invasive ductal carcinomas. *Oncol.Rep.* 12, 1239–1243.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R., Jones, C., Coleman, H., and McCain, R. (2018). Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. *World J. Gastroenterol.* 24, 4846-4861.
- Morris, J.P., Cano, D.A., Sekine, S., Wang, S.C., and Hebrok, M. (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 508–520.
- Mosnier, J.-F. (2012). Digestive metaplasia: biology and physiopathology. *Ann Pathol.* 32, S67-69.
- Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J.* 31, 3079–3091.
- Pilati, C., Taieb, J., Balogoun, R., Marisa, L., de Reyniès, A., and Laurent-Puig, P. (2017). CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. *Ann. Oncol.* 28, 1032–1035.
- Pittman, M.E., Brosens, L.A.A., and Wood, L.D. (2016). Genetic Syndromes with Pancreatic Manifestations. *Surg Pathol Clin* 9, 705–715.
- Sakamoto, N., Feng, Y., Stolfi, C., Kurosu, Y., Green, M., Lin, J., Green, M.E., Sentani, K., Yasui, W., McMahon, M., et al. (2017). BRAFV600E cooperates with CDX2 inactivation to promote serrated colorectal tumorigenesis. *Elife* 6, e20331.
- Salari, K., Spulak, M.E., Cuff, J., Forster, A.D., Giacomini, C.P., Huang, S., Ko, M.E., Lin, A.Y., van de Rijn, M., and Pollack, J.R. (2012). CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E3196-3205.
- Storz, P., and Crawford, H. (2020). Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 158, 2072-2081.
- Stringer, E.J., Duluc, I., Saandi, T., Davidson, I., Bialecka, M., Sato, T., Barker, N., Clevers, H., Pritchard, C.A., Winton, D.J., et al. (2012). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development.* 139, 465–474.
- Verzi, M.P., Shin, H., Ho, L.-L., Liu, X.S., and Shivdasani, R.A. (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2026–2039.

- Witek, M.E., Snook, A.E., Lin, J.E., Blomain, E.S., Xiang, B., Magee, M.S., Magee, M., and Waldman, S.A. (2014). A novel CDX2 isoform regulates alternative splicing. *PLoS ONE* 9, e104293.
- Xiao, W., Hong, H., Awadallah, A., Zhou, L., and Xin, W. (2014). Utilization of CDX2 expression in diagnosing pancreatic ductal adenocarcinoma and predicting prognosis. *PLoS ONE* 9, e86853.
- Yin, C. (2017). Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas. *Semin. Cell Dev. Biol.* 63, 68–78.

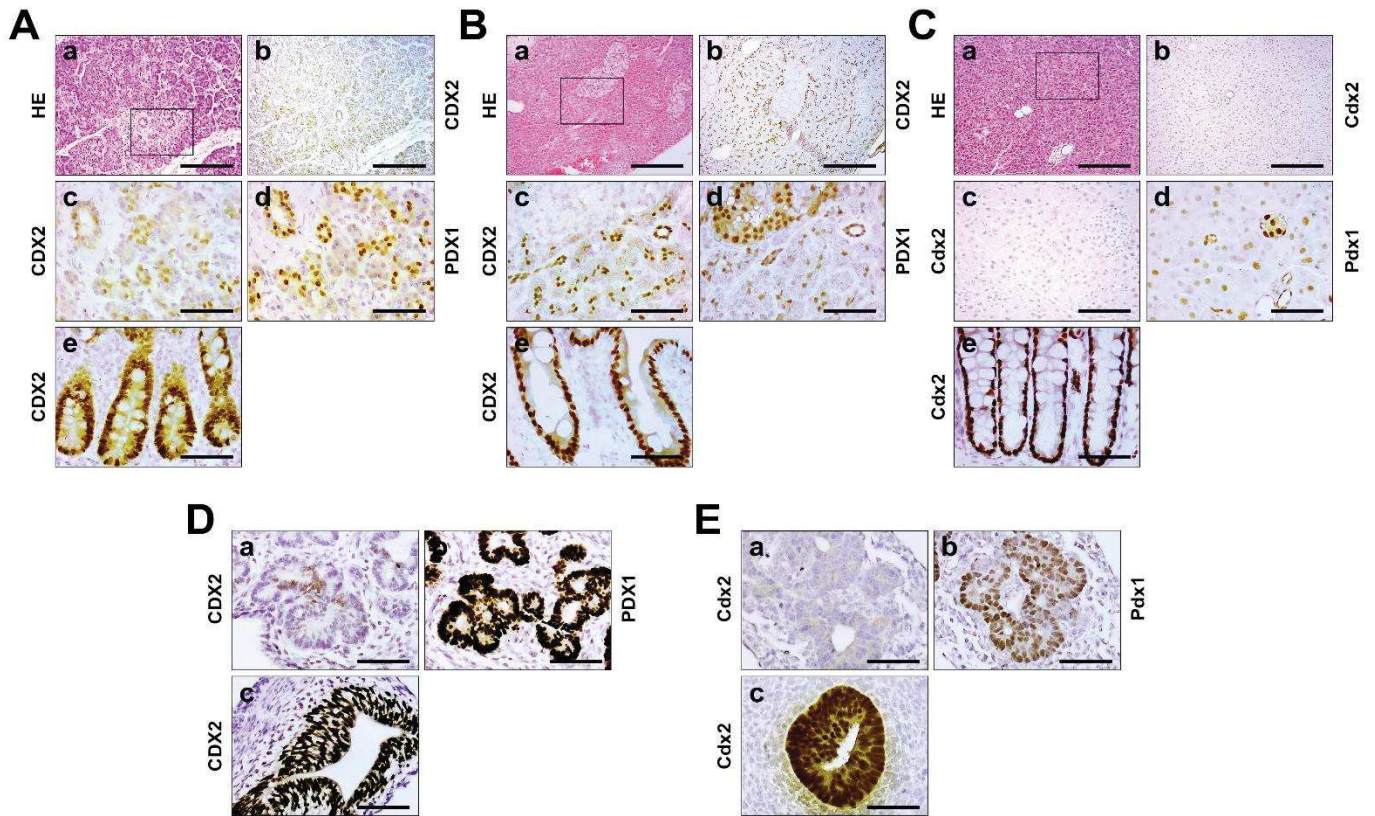


Figure 1

Pancreatic expression of CDX2

A-C. Immunodetection of the CDX2 protein in the adult human (**A**), pig (**B**) and mouse (**C**) pancreas. (a): HE staining; (b, c) CDX2; (d): PDX1. (e): CDX2 in the human small intestine, in the pig cecum and in the mouse ileum, respectively. Boxed regions in (a) are enlarged in (c) and (d). Bars are 200 μm in (a) and (b), and 40 μm in (c), (d) and (e).

D-E. Immunodetection of the CDX2 protein in the pancreas premordium of a 56-days human embryo (**D**) and of an E12.5 mouse embryo (**E**). (a) CDX2; (b) PDX1; (c) CDX2 in the adjacent intestinal primordium. Bars are 40 μm .

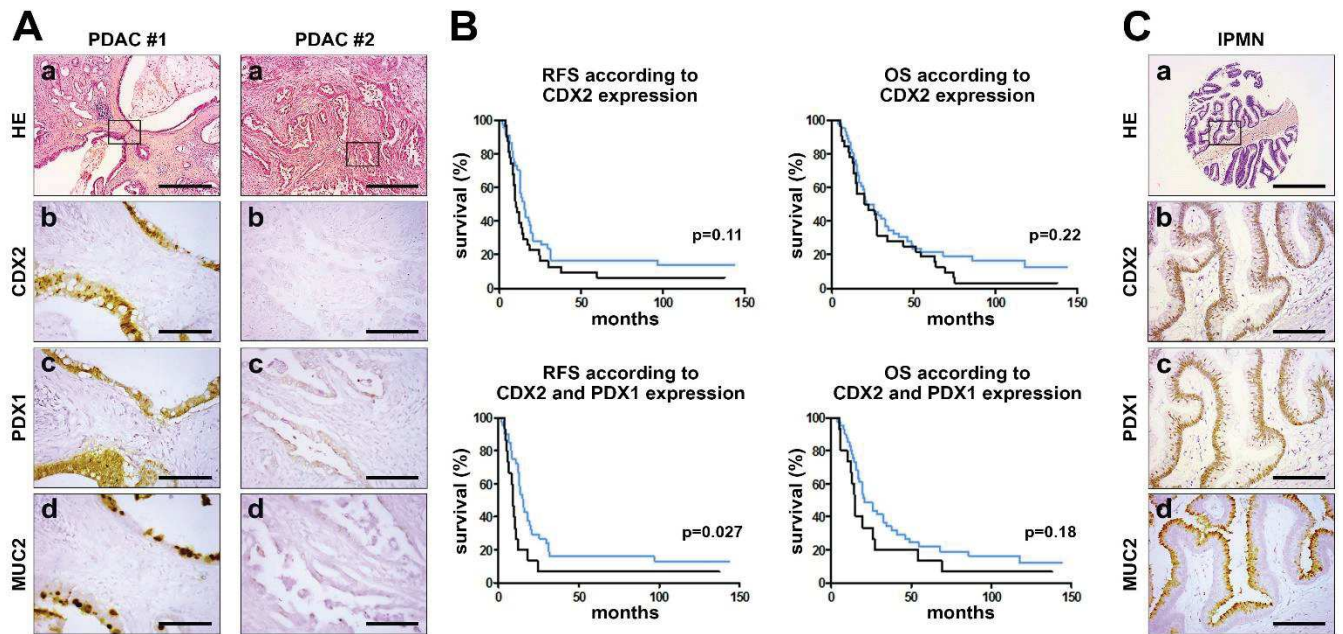


Figure 2

CDX2 expression in human PDACs and IPMNs

A. Expression patterns in the PDACs of two patients: (a): HE staining; (b): CDX2; (c) PDX1; (d): MUC2. Boxed regions in (a) are enlarged in (b-d). Bars are 400 μm in (a) and 100 μm in (b-d). **B.** Recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS) according to CDX2 expression (a) and (b) and to CDX2 + PDX1 expression (c) and (d). CDX2^{pos} and CDX2^{neg} are respectively in blue and black in (a) and (b); CDX2^{pos}+PDX1^{pos} and CDX2^{neg}+PDX1^{neg} are respectively in blue and black in (c) and (d). *p*-values of the log-rank test are indicated. **C.** Intestinal-type IPMN: (a): HE staining; (b): CDX2; (c) PDX1; (d): MUC2. The boxed region in (a) is enlarged in (b-d). Bars are 400 μm in (a) and 100 μm in (b-d).

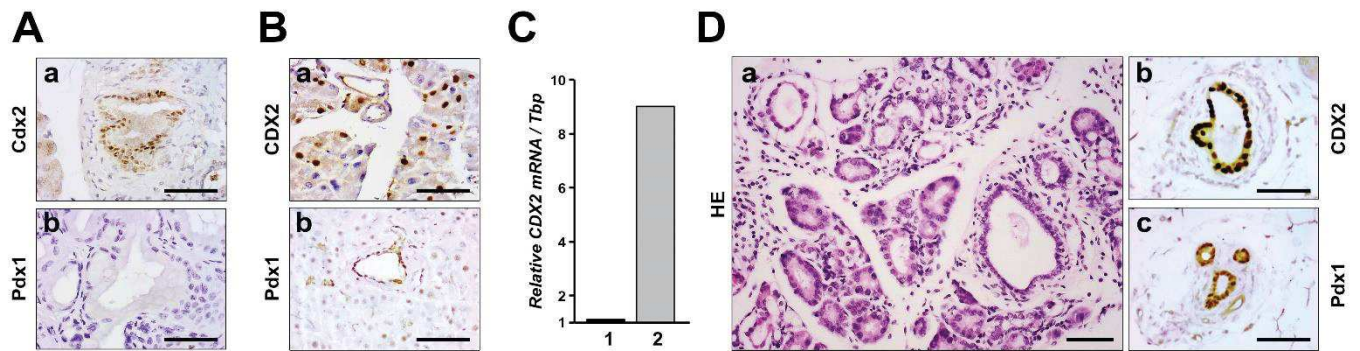


Figure 3

Ectopic expression of CDX2 in the mouse pancreas

A. Abnormal expression of the endogenous Cdx2 protein in PanINs of *Pdx1Cre::Rosa-LSL-KRAS^{G12D}* mice. **(a):** Cdx2; **(b):** Pdx1. **B.** Ectopic induction of human CDX2 in the pancreas of *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice 1 day after β NF+Tam treatment. CDX2 **(a)** and Pdx1 **(b)** proteins detected by immunohistochemistry. **C.** Transgenic *CDX2* mRNA revealed by RTqPCR in the pancreas of *Control* and *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice 2 months after β NF+Tam treatment. **D.** Pancreatic lesion occurring 4 months after the induction of ectopic CDX2 expression in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice. **(a):** HE; **(b):** CDX2; **(c):** Pdx1. Bars are 40 μ m.

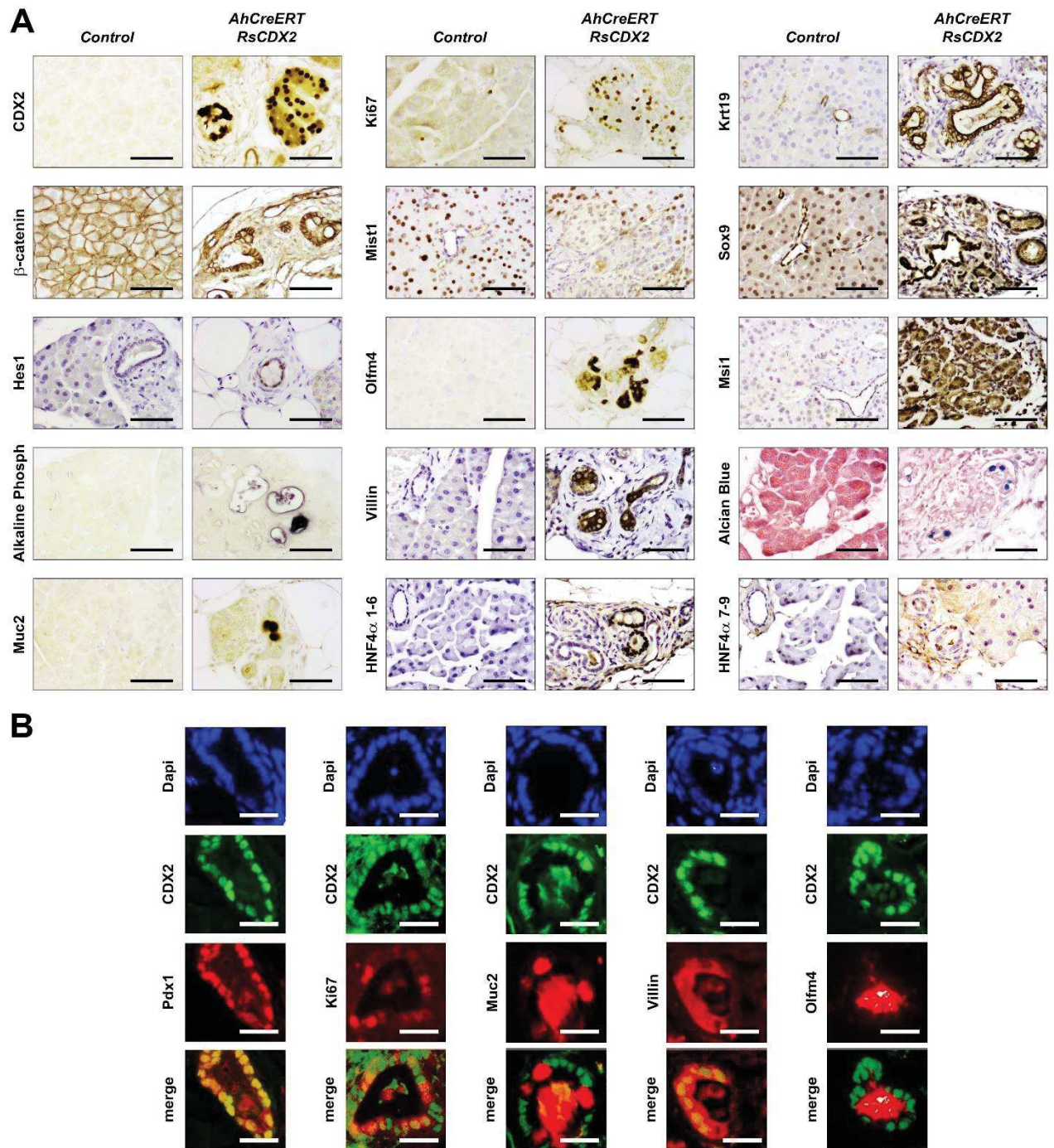


Figure 4

Immunohistological characterization of the pancreatic lesions induced by ectopic CDX2

A. Immunohistochemical detection of the indicated proteins in *Control* and *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice. Bars are 40 μ m.

B. Co-immunofluorescence detection of the indicated proteins together with CDX2 in *AhCre^{ERT}::RsCDX2* mice. Bars are 20 μ m.

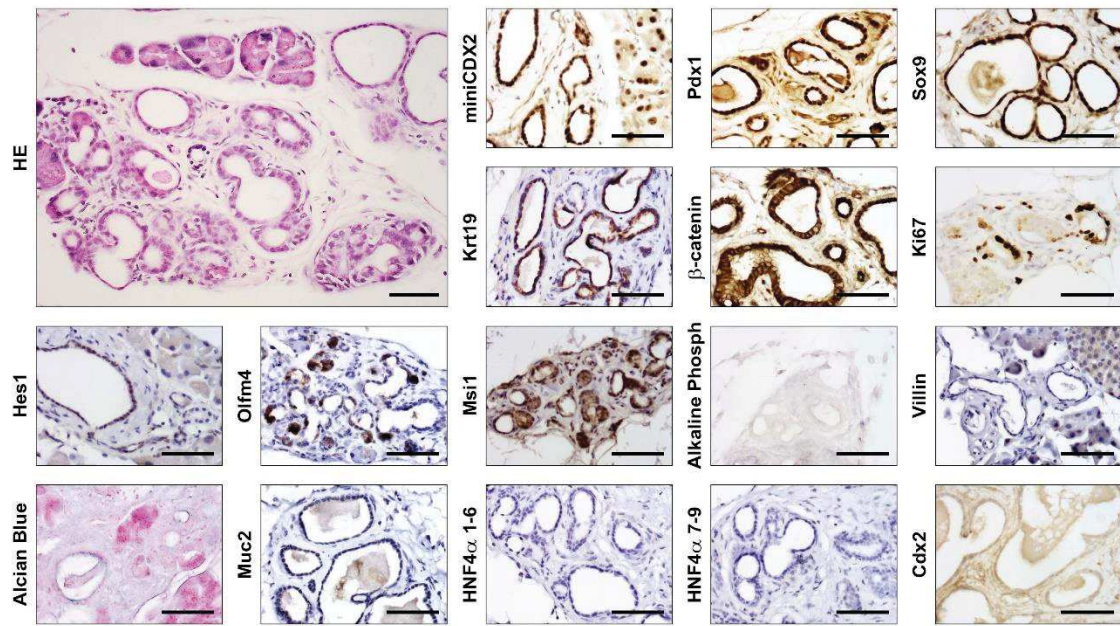


Figure 5

Immunohistological characterization of the pancreatic lesions induced by ectopic miniCDX2

Immunohistochemical detection of the indicated proteins in *VilCre::jojo-miniCDX2* mice.

Controls are as in the Figure 4. Bars are 40 μ m.

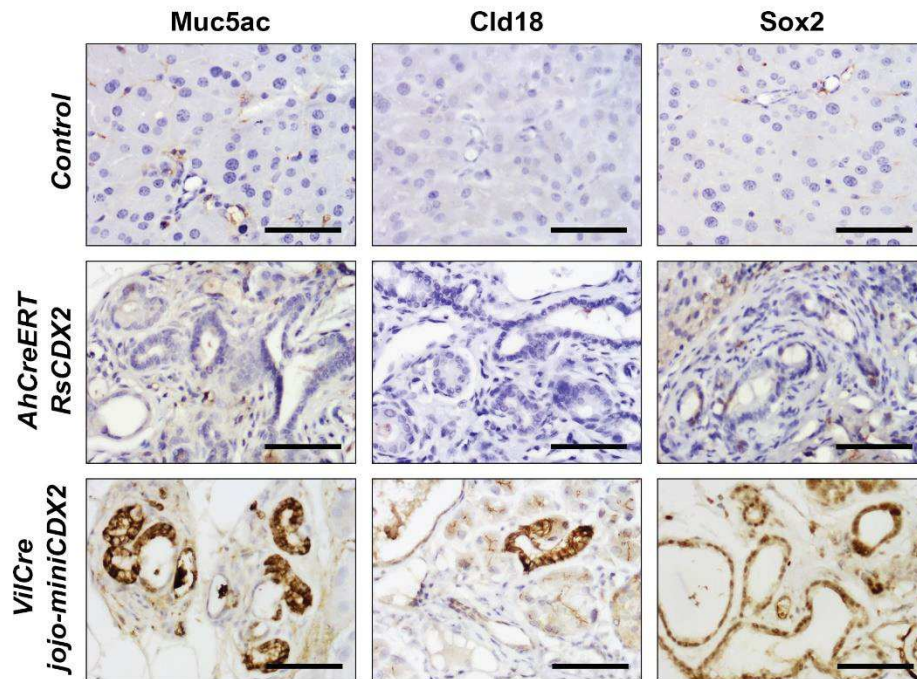


Figure 6

Gastric-type differentiation in the ADMs resulting from CDX2 or miniCDX2 expression

Immunohistochemical detection of the indicated gastric-type proteins in *Control*, *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice. Bars are 40 μ m.

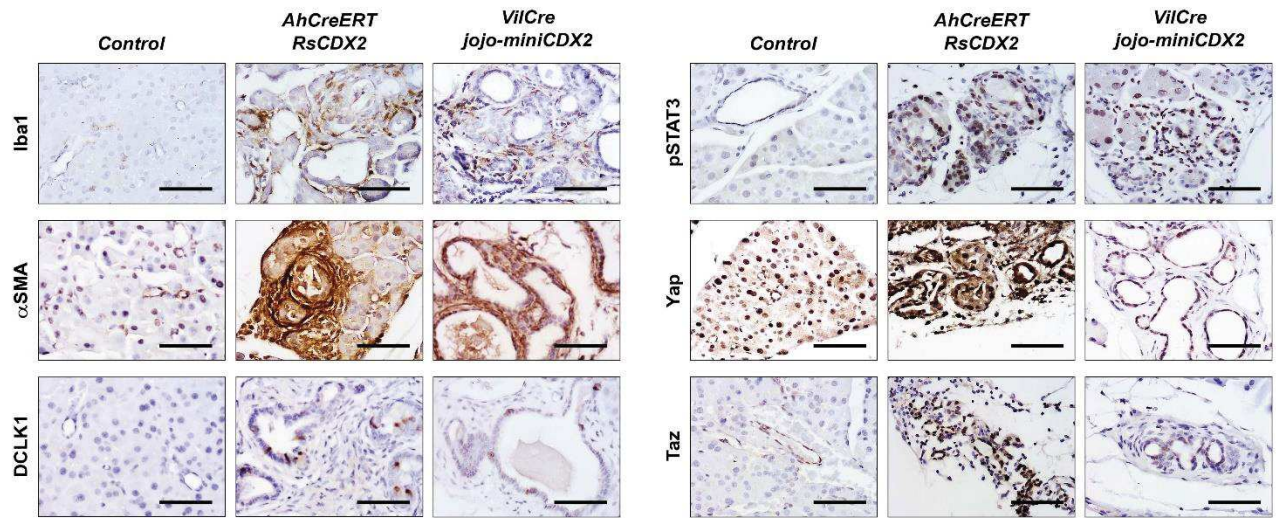


Figure 7

Cells interactions and signaling in the ADMs lesions of *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice

Immunohistochemical detection of the indicated proteins in *Control*, *AhCre^{ERT}::RsCDX2* and *VilCre::jojo-miniCDX2* mice. Bars are 40 μ m.

			CDX2-	CDX2+	
Number of patients	78	100%	46	32	
Age (years)	65.5	(45-78)			
Sex					p = 0.498
Male	40	51.3%	18	22	
Female	38	48.7%	14	24	
Type of surgery					p = 0.162
Pancreatoduodenectomy	60	76.9%	23	37	
Pancreatosplenectomy	12	15.4%	8	4	
Total pancreatectomy	5	6.4%	1	4	
Distal pancreatectomy	1	1.3%	0	1	
SMV/PV resection					p = 0.815
Yes	28	35.9%	12	16	
No	50	64.1%	20	30	
Lymphadenectomy					p = 0.179
Standard	18	23.1%	10	8	
Extended	60	76.9%	22	38	
Primary tumour (T)					p = 0.31
pT1	1	1.3%	1	0	
pT2	2	2.6%	0	2	
pT3	75	96.1%	31	44	
Regional lymph nodes (N)					p = 0.8
N0	21	26.9%	8	13	
N1	57	73.1%	24	33	
SMV/PV invasion					p = 1
Yes	24	30.8%	10	14	
No	54	69.2%	22	32	
Differentiation grade					p = 0.812
Well differentiated	7	9%	2	5	
Moderate differentiated	31	39.7%	14	17	
Poorly differentiated	25	32%	11	14	
Unknown	15	19.3%	5	10	
Blood vessel invasion					p = 0.234
Yes	28	35.9%	15	13	
No	4	5.1%	1	3	
Unknown	46	59%	16	30	
Perineural infiltration					p = 0.824
Yes	41	52.5%	18	23	
No	2	2.6%	1	1	
Unknown	35	44.9%	13	22	
Low-grade PanIN					p = 0.356
Yes	35	44.9%	12	23	
No	43	55.1%	20	23	
High-grade PanIN					p = 1
Yes	47	60.3%	19	28	
No	31	39.7%	13	18	
Acinar-ductal metaplasia					p = 0.362
Yes	13	16.7%	7	6	
No	65	83.3%	25	40	

Supplementary Table 1. Clinical and pathological characteristics of patients.

DISCUSSION

4. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE

4.1. CDX2 : Profil d'expression et impact sur la survie dans l'adénocarcinome pancréatique chez l'homme

Le but de ce travail rétrospectif monocentrique était d'analyser le profil d'expression de CDX2 et son impact sur la SG et la SSR chez 78 patients opérés d'emblée à visée curative pour un adénocarcinome pancréatique, et recevant par la suite une chimiothérapie adjuvante par Gemcitabine.

Dans notre cohorte, deux groupes de patients ont pu être définis selon l'expression de CDX2 (positive ou négative) dans les cellules tumorales pancréatiques. Une expression du facteur de transcription CDX2 dans la tumeur pancréatique était mise en évidence dans 59 % des cas. L'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome du pancréas ne différait pas en fonction du sexe, du type de chirurgie réalisé, de l'envahissement vasculaire, ganglionnaire ou nerveux, du grade de différenciation ou de la présence de lésions pré-cancéreuses. Ces résultats sont à confirmer en raison de données incomplètes pour certains patients. Ceci peut être en partie expliqué par une des limites de ce travail à savoir son caractère rétrospectif. En effet, pour certains facteurs potentiellement particulièrement importants pour le pronostic (comme le grade de différenciation par exemple), le caractère rétrospectif engendre un manque de données. Néanmoins l'avantage de cette cohorte rétrospective est d'avoir pu obtenir un suivi sur le long terme (supérieur à 5 ans).

Nos résultats montrent que l'expression de CDX2 dans la tumeur est associée à une meilleure SSR et SG. La différence de SSR et de SG n'est pas statistiquement significative malgré une augmentation nette de la survie dans le groupe de patients exprimant CDX2 et le fait que les rares patients encore en vie à la date de point font majoritairement partie de ce groupe. Ces résultats concordent avec le travail de Matsumoto et al. leur étude concernait 30

patients opérés pour un adénocarcinome canalaire pancréatique et suggérait que l'expression de CDX2 était associée à un meilleur pronostic ($p = 0,015$) (Matsumoto et al. 2004). A l'inverse, nos résultats diffèrent de ceux de Xiao et al. qui mettaient en évidence une diminution significative de la SG en cas d'expression de CDX2 (308 jours versus 586 jours ; $p = 0,0067$) (Xiao et al. 2014). Cette différence est peut-être liée au fait que dans le travail de Xiao et al, un marquage de CDX2 inférieur à 1 % des cellules tumorales était considéré comme négatif, alors que dans notre travail, les patients ayant un marquage inférieur à 1 % ont été considérés comme positifs.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'expression combinée de CDX2 et de PDX1 dans les cellules tumorales est significativement associée à une meilleure SSR. PDX1 est un facteur de transcription présent dans les progéniteurs de l'ensemble des cellules pancréatiques (endocrines et exocrines). L'absence d'expression de CDX2, mais aussi de PDX1 dans l'adénocarcinome pancréatique, apparaît donc comme un facteur de mauvais pronostic.

Nous avons réalisé une étude complémentaire originale portant sur 15 patients issus de notre cohorte du CHU de Strasbourg ($n = 78$), considérés comme longs survivants c'est-à-dire qu'ils étaient en vie 60 mois après l'exérèse chirurgicale de la tumeur pancréatique. L'expression de CDX2 dans la tumeur pancréatique était mise en évidence dans 9 cas sur 15. Celle-ci était associée à un meilleur pronostic que ce soit en termes de survie globale ou de survie sans récurrence, ce qui confirme nos résultats précédents. Sur cette base, indiquant que CDX2 pourrait être un facteur de bon pronostic, nous avons réalisé cette même étude sur une 2^{ème} cohorte de patients longs survivants ($n = 39$) provenant de l'hôpital Beaujon, Paris. Le taux de positivité du marquage CDX2 dans cette cohorte était inférieur : 30,8 % versus 60 % dans celle de Strasbourg. De plus, il existait un bénéfice en terme de SSR en l'absence d'expression de CDX2 dans la tumeur. Ces résultats discordants entre les deux cohortes de patients longs survivants peuvent s'expliquer par le fait que ces deux cohortes présentaient des caractéristiques

différentes, rendant la comparaison des deux groupes difficile. En effet, il s'agissait de patients dont la prise en charge thérapeutique différait, que ce soit en pré ou post opératoire, du fait d'une période d'inclusion antérieure à celle de notre cohorte. Il serait intéressant de poursuivre ce travail en homogénéisant les critères d'inclusion des patients et en augmentant le nombre de patients.

4.2. Conséquences physiopathologiques de l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas grâce à un modèle murin

La mutation activatrice de KRAS est la plus fréquente des modifications génétiques dans l'adénocarcinome pancréatique. Les lésions qu'elle induit ont été reproduites grâce au modèle transgénique chez la souris *Pdx1-Cre::Kras^{G12D}*. Bien que le gène *Cdx2* ne soit pas exprimé dans le pancréas murin normal, l'expression de la protéine Cdx2 a été mise en évidence dans certaines lésions pancréatiques qui se développent chez ces animaux, mais cet événement est rare et inconstant. Ceci démontre la capacité du gène homéotique *Cdx2* à être anormalement activé au sein du pancréas murin dans un contexte pro-oncogénique lié à la mutation activatrice de *Kras*.

L'étude des conséquences fonctionnelles de l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas, en utilisant le modèle murin *RsCDX2::AhCre^{ERT}*, a fourni des résultats intéressants. En effet, dans la partie exocrine du pancréas, l'expression ectopique du gène d'identité intestinale *CDX2* se traduit par l'acquisition d'une métaplasie acino-canalaire. Elle correspond à une perte des structures acinaires au profit de structures canalaire. Dans notre modèle, la métaplasie acino-canalaire s'accompagne d'une adipose pancréatique importante et d'une inflammation. L'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas exocrine entraîne l'activation d'un programme de type intestinal conduisant à l'expression de marqueurs de différenciation des cellules intestinales des lignages absorbant (Villine, Phosphatase alcaline) et sécréteur

(Muc2) en faveur de lésions métaplasiques de type intestinal. Mais contrairement à ce qui a été mis en évidence dans la muqueuse gastrique, l'expression ectopique de CDX2 ne semble pas suffisante pour conférer une identité intestinale complète à l'épithélium canalaire pancréatique. En effet, on ne constate pas de modifications architecturales de type villosités ou cryptes, et les quatre types cellulaires intestinaux principaux ne sont pas tous présents (ex : cellules de Paneth). Cependant, on visualise la présence de marqueurs de cellules progénitrices de l'intestin au sein de ces lésions. La capacité de CDX2 à dicter l'identité intestinale dans les organes digestifs non intestinaux semble donc dépendre du contexte cellulaire.

De plus, l'expression de CDX2 dans l'épithélium canalaire pancréatique adulte de souris semble être associée à l'expression de Pdx1, acteur majeur de la différenciation pancréatique, dans la métaplasie acino-canalaire. Une des hypothèses pourrait être la suivante : CDX2 engendre l'apparition d'une métaplasie acino-canalaire, Pdx1 est alors activé afin de maintenir l'identité pancréatique dans les cellules métaplasiques du pancréas exocrine. Ceci peut être corroboré par le fait que d'autres marqueurs de cellules progénitrices pancréatiques, comme Sox9 et Hes1, sont exprimés au sein de ces lésions.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives concernant la physiopathologie du pancréas. Les résultats obtenus chez les souris *RsCDX2::AhCre^{ERT}* ont mis en évidence un processus métaplasique de type acino-canalaire dans le pancréas pouvant s'accompagner d'une transdifférenciation intestinale partielle. Chez l'homme, la classification des lésions précurseurs de l'adénocarcinome du pancréas considère la métaplasie acino-canalaire comme une lésion précancéreuse. Elle est observée dans la pancréatite chronique mais aussi chez des patients ayant des antécédents familiaux de cancer pancréatique. Cependant, la séquence moléculaire de cette lésion n'est pas complètement connue : notre modèle pourrait permettre de la caractériser. De plus, ce phénotype pancréatique avec présence de cellules productrices de mucus au sein de la métaplasie acino-canalaire rappelle les TIPMP de type intestinal

caractérisées par une expression de CDX2 et de la mucine MUC2. Cependant, au stade actuel (soit 18 mois après l'induction de l'expression de CDX2), nous n'avons pas observé d'évolution cancéreuse spontanée chez les souris étudiées. Ceci indique soit que ces lésions n'évoluent pas naturellement en cancer chez la souris, soit que la durée de vie limitée de la souris empêche l'évolution maligne de ces lésions.

L'expression ectopique du variant d'épissage de CDX2 : miniCDX2 dans le pancréas exocrine entraîne également l'apparition de métaplasies acino-canaliaires, cependant avec une pénétrance inférieure à celle de l'expression de CDX2. Néanmoins, ces métaplasies acino-canaliaires n'expriment pas de marqueurs intestinaux. Ce résultat est extrêmement intéressant car il met en évidence une dissociation de la fonction d'induction des métaplasies acino-canaliaires (par le domaine de liaison à l'ADN commun à CDX2 et miniCDX2) et de la fonction d'induction de la transdifférenciation intestinale (qui requiert le domaine de transactivation de CDX2). Globalement, nos résultats suggèrent que l'occupation anormale des sites chromatinien reconnus par la protéine CDX2 (ainsi que par la protéine transcriptionnellement inactive miniCDX2) entraîne un processus de formation des métaplasies acino-canaliaires qui semble être indirect et qui partage de nombreuses propriétés avec d'autres situations de formation de ce type de métaplasies chez l'homme ou chez la souris : l'activation des cellules étoilées en myofibroblastes, le recrutement de macrophages, l'essor de cellules progénitrices DCKL1⁺, l'activation de la voie Jak/Stat et finalement l'activation de la voie Hippo. Lorsque ce processus est associé à l'activité transcriptionnelle de CDX2, il peut alors évoluer vers la trans-différenciation de type intestinal, conformément à la fonction développementale et physiologique de cette protéine homéotique dans l'endoderme puis l'épithélium intestinal.

Bien que les lésions pancréatiques résultant de l'expression ectopique de CDX2 chez la souris n'évoluent pas spontanément en cancer, la question du rôle de CDX2 dans le processus tumoral demeure ouverte au regard de la fonction de suppresseur de tumeur jouée par ce gène

dans l'intestin et de son rôle oncogénique dans le système hématopoïétique. C'est pourquoi, nous avons développé des modèles murins combinant la formation de métaplasies acino-canaliaires en réponse à CDX2 et la prédisposition génétique à la cancérogenèse. Lorsque les souris *RsCDX2::AhCre^{ERT}* sont placées dans un contexte génétique de prédisposition à la cancérogenèse intestinale *Apc^{+/ Δ 14}*, elles ne semblent pas développer de tumeur pancréatique à ce stade de l'étude. De même considérant la voie Ras, nous n'avons pas observé d'adénocarcinome pancréatique chez les souris *Rosa-G12D-Kras::RsCDX2::AhCre^{ERT}* mais celles-ci n'ont probablement pas pu être maintenues en vie suffisamment longtemps (en raison de lésions occlusives dans l'estomac) pour permettre une éventuelle évolution des métaplasies acino-canaliaires en adénocarcinome. Afin de poursuivre ce travail, nous sommes en train de réaliser d'autres croisements qui permettent d'induire une expression ectopique de CDX2 spécifiquement dans le pancréas exocrine à l'âge adulte. Ce modèle murin, complexe, est à l'étude au laboratoire.

4.3. Conclusion générale

Les adénocarcinomes du pancréas représentent un problème considérable en Santé Publique en raison de leur incidence croissante et de leur extrême gravité. Dans ce cadre, la connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorale, et le développement de modèles précliniques appropriés pour tester des approches thérapeutiques innovantes constituent des enjeux importants. Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que l'expression de CDX2 dans l'adénocarcinome pancréatique est associée à un meilleur pronostic. En outre, la réalisation de ce travail a permis de développer un modèle murin préclinique reproduisant plusieurs lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique, à savoir la métaplasie acino-canalaire et la TIPMP de type intestinal. Ce modèle pourrait servir de rationnel pour des études ultérieures visant à développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans la perspective de la médecine personnalisée.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abate-Shen, C. 2002. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature Reviews Cancer* 2: 777-85.

Aguirre, A.J., Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson D.A, Horner J, Redston M.S, et DePinho R.A. 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 17: 3112-26.

Ahn, S.S, Kim M.J, Choi JY, Hong HS, Chung Y.E, et Lim J.S. 2009. Indicative findings of pancreatic cancer in prediagnostic CT. *European Radiology* 19: 2448-55.

Al-Hawary, M.M, Francis I.R, Chari S.T, Fishman E.K, Hough D.M, Lu D.S, Macari M, et al. 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the Society of abdominal radiology and the American pancreatic association. *Gastroenterology* 146: 291-304.

Aoki, K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, et Taketo M.M. 2003. Colonic polyposis caused by MTOR-mediated chromosomal instability in Apc⁺/Delta716 Cdx2^{+/-} compound mutant mice. *Nature Genetics* 35: 323-30.

Aoki, K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, et Taketo M.M. 2011. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Research* 71: 593-602.

Apelqvist, A., Ahlgren U, et Edlund H. 1997. Sonic Hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Current Biology* 7: 801-4.

Arends, J.W, Verstynen C, Bosman F.T, Hilgers J, et Steplowski Z. 1983. Distribution of monoclonal antibody-defined monosialoganglioside in normal and cancerous human tissues: an immunoperoxidase study. *Hybridoma* 2: 219-29.

Arslan, A.A, Helzlsouer K.J, Kooperberg C, Shu X.O, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita H.B, Fuchs C.S, et al. 2010. Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Archives of Internal Medicine* 170: 791-802.

van Asperen, C.J, Brohet R.M, Meijers-Heijboer E.J, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Vasen H.F, Ausems M.G, et al. 2005. Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *Journal of Medical Genetics* 42: 711-19.

B

Baba Y, Noshio K, Shima K, Freed E, Irahara N, Philips J, Meyerhardt J.A, et al. 2009. Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 15: 4665-73.

Bailey, P, Chang DK, Nones K, Johns A.L, Patch A.M, Gingras M.C, Miller D.K, et al. 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531: 47-52.

Balbinot, C, Vanier M, Armant O, Nair A, Penichon J, Soret C, Martin E, et al. 2017. Fine-tuning and autoregulation of the intestinal determinant and tumor suppressor homeobox gene CDX2 by alternative splicing. *Cell Death and Differentiation* 24: 2173-86.

- Balbinot, C, Armant O, Elarouci N, Marisa L, Martin E, De Clara E, Onea A, et al. 2018. The Cdx2 homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine* 215: 911-26.
- Banks, P.A. Bollen T.L, Dervenis C, Gooszen H.G, Johnson C.D, Sarr M.G, Tsiotos G.G, Vege S.S, et Acute Pancreatitis Classification Working Group. 2013. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by International Consensus. *Gut* 62: 102-11.
- Bardeesy, N, Aguirre A.J, Chu G.C, Cheng K.H, Lopez L.V, Hezel A.F, Feng B, et al. 2006. Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5947-52.
- Bardeesy, N, Cheng K.H, Berger J.H, Chu G.C, Pahler J, Olson P, Hezel A.F, et al. 2006. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes & Development* 20: 3130-46.
- Barros, R, Pereira B, Duluc I, Azevedo M, Mendes N, Camilo V, Jacobs R.J, et al. 2008. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *The Journal of Pathology* 215: 411-20.
- Basturk, O, Hong S.M, Wood L.D, Adsay N.V, Albores-Saavedra J, Biankin A.V, Brosens L.A, et al. 2015. A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *The American Journal of Surgical Pathology* 39: 1730-41.
- Benahmed, F, Gross I, Gaunt S.J, Beck F, Jehan F, Domon-Dell C, Martin E, Kedinger M, Freund J.N, et Duluc I. 2008. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology* 135: 1238-47.
- Beyer, G, Habtezion A, Werner J, Lerch M.M, et Mayerle J. 2020. Chronic pancreatitis. *Lancet* 396: 499-512.
- Bhanot, U.K, et Möller P. 2009. Mechanisms of parenchymal injury and signaling pathways in ectatic ducts of chronic pancreatitis: implications for pancreatic carcinogenesis. *Laboratory Investigation* 89: 489-97.
- Bhushan, A., Itoh N, Kato S, Thiery J.P, Czernichow P, Bellusci S, et Scharfmann R. 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 128: 5109-17.
- Biankin, A.V, Waddell N, Kassahn K.S, Gingras M.C, Muthuswamy L.B, Johns A.L, Miller D.K, et al. 2012. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491: 399-405.
- Bonhomme, C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard M.P, Kedinger M, Beck F, Freund J.N, et Domon-Dell C. 2003. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 52: 1465-71.
- Bosetti, C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen G.M, Bracci P.M, Neale R.E, et al. 2014. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International pancreatic cancer case-control consortium. *Annals of Oncology* 25: 2065-72.

Bournet, B, Dufresne M, Selves J, Torrisani J, Cordelier P, et Buscail L. 2013. Kras oncogene and pancreatic cancer. *Medecine Sciences* 29: 991-97.

Brabletz, T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns C.J, Jung A, et al. 2004. Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Research* 64: 6973-77.

Brierley, J.D, Gospodarowicz M.K, et Wittekind C. 2017. TNM Classification of malignant tumours. *John Wiley & Sons*.

Burris, H.A, Moore M.J, Andersen J, Green M.R, Rothenberg M.L, Modiano M.R, Cripps M.C, et al. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 15: 2403-13.

C

Casillas, J, Granville C, Quiroz A, et Ruiz-Cordero R. 2016. Embryology of the pancreas and normal variants. *In multidisciplinary teaching atlas of the pancreas: radiological, surgical, and pathological correlations* 3-47.

CDU-HGE. 2014. Chapitre 7 – Pancréas. *Les fondamentaux de la pathologie digestive*.

Chang, C.L, Lao-Sirieix P, Save V, De La Cueva Mendez G, Laskey R, et Fitzgerald R.C. 2007. Retinoic acid-induced glandular differentiation of the oesophagus. *Gut* 56: 906-17.

Chawengsaksophak, K, et Beck F. 1996. Chromosomal localization of Cdx2, a murine homologue of the drosophila gene caudal, to mouse chromosome 5. *Genomics* 34: 270-71.

Chawengsaksophak, K, James R, Hammond V.E, Köntgen F, et Beck F. 1997. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386: 84-87.

Chawengsaksophak, K, de Graaff W, Rossant J, Deschamps J, et Beck F. 2004. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7641-45.

Conrad, C, et Fernández-Del Castillo C. 2013. Preoperative evaluation and management of the pancreatic head mass. *Journal of Surgical Oncology* 107: 23-32.

Conroy, T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, et al. 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 364: 1817-25.

Conroy, T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei A.C, Raoul J.L, Choné L, et al. 2018. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 379: 2395-2406.

Couch, F.J, Johnson M.R, Rabe K.G, Brune K, de Andrade M, Goggins M, Rothenmund H, et al. 2007. The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 16: 342-46.

D

- Dalerba, P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, Wilcox-Fogel N, et al. 2016. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 374: 211-22.
- De Sousa E Melo, F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij L.P, de Jong J.H, et al. 2013. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nature Medicine* 19: 614-18.
- De Vas, M.G, Kopp J.L, Heliot C, Sander M, Cereghini S, et Haumaitre C. 2015. Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3⁺ endocrine progenitors. *Development* 142: 871-82.
- De Waele, E, Wauters E, Ling Z, et Bouwens L. 2014. Conversion of human pancreatic acinar cells toward a ductal-mesenchymal phenotype and the role of transforming growth factor β and activin signaling. *Pancreas* 43: 1083-92.
- Delpu, Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, et Cordelier P. 2011. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current Genomics* 12: 15-24.
- Desgraz, R, et Herrera P.L. 2009. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136: 3567-74.
- Deutsch, G, Jung J, Zheng M, Lórá J, et Zaret K.S. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128: 871-81.
- Dichmann, D.S, Miller C.P, Jensen J, Heller R.S, et Serup P. 2003. Expression and misexpression of members of the FGF and TGFbeta families of growth factors in the developing mouse pancreas. *Developmental Dynamics* 226: 663-74.
- Distler, M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, et Grützmann R. 2014. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International* 2014: 474905.
- Drummond, F, Putt W, Fox M, et Edwards Y.H. 1997. Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene. *Annals of Human Genetics* 61: 393-400.

F

- Ferlay, J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, et Bray F. 2018. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer* 103: 356-87.
- Fernández-del Castillo, C, et Adsay N.V. 2010. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 139: 708-13.
- Franchi, A, Massi D, Palomba A, Biancalani M, et Santucci M. 2004. CDX-2, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 immunohistochemical expression in the differential diagnosis of primary adenocarcinomas of the sinonasal tract. *Virchows Archiv* 445: 63-67.
- Freund, J.N, Duluc I, Reimund J.M, Gross I, et Domon-Dell C. 2015. Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities. *World Journal of Gastroenterology* 21: 1436-43.

Frossard, J.L, Steer M.L, et Pastor C.M. 2008. Acute pancreatitis. *Lancet* 371: 143-52.

Furukawa, T, Klöppel G, Adsay N.V, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, Hruban R.H, et al. 2005. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Archiv* 447 (5): 794-99.

G

Gao, N, White P, et Kaestner K.H. 2009. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Developmental Cell* 16: 588-99.

Garcia-Fernández, J. 2005. Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity* 94: 145-52.

Giardiello, F.M, Offerhaus G.J, Lee D.H, Krush A.J, Tersmette A.C, Booker S.V, Kelley N.C, et Hamilton S.R. 1993. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut* 34: 1394-96.

Giardiello, F.M, Welsh S.B, Hamilton S.R, Offerhaus G.J, Gittelsohn A.M, Booker S.V, Krush A.J, Yardley J.H, et Luk G.D. 1987. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *The New England Journal of Medicine* 316: 1511-14.

Golan, T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall M.J, Park J.O, et al. 2019. Maintenance Olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 381: 317-27.

Goldstein, A.M, Fraser M.C, Struewing J.P, Hussussian C.J, Ranade K, Zametkin D.P, Fontaine L.S, Organic S.M, Dracopoli N.C, et Clark W.H. 1995. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with P16INK4 mutations. *The New England Journal of Medicine* 333: 970-74.

Gong, T.T, Hu D.M, et Zhu Q. 2012. Contrast-enhanced EUS for differential diagnosis of pancreatic mass lesions: a meta-analysis. *Gastrointestinal Endoscopy* 76: 301-9.

Gottrand, F, et Turck D. 2016. *Gastroentérologie pédiatrique*.

Gouzi, M, Kim Y.H, Katsumoto K, Johansson K, et Grapin-Botton A. 2011. Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development. *Developmental Dynamics* 240: 589-604.

Gradwohl, G, Dierich A, LeMeur M, et Guillemot F. 2000. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1607-11.

Grainger, S, Savory J.G, et Lohnes D. 2010. Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. *Developmental Biology* 339: 155-65.

Grall, E, Gourain V, Naïr A, Martin E, Birling M.C, Freund J.N, et Duluc I. 2019. Severe head dysgenesis resulting from imbalance between anterior and posterior ontogenetic programs. *Cell Death & Disease* 10: 812.

Gross, I, Duluc I, Benameur T, Calon A, Martin E, Brabletz T, Kedinger M, Domon-Dell C, et Freund J.N. 2008. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* 27: 107-15.

Gross, I, Lhermitte B, Domon-Dell C, Duluc I, Martin E, Gaiddon C, Kedinger M, et Freund J.N. 2005. Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* 24: 7955-63.

Guerra, C, Schuhmacher A.J, Cañamero M, Grippo P.J, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren E.P, et Barbacid M. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11: 291-302.

Guo, M.Z, House M.G, Suzuki H, Ye Y, Brock M.V, Lu F, Liu Z, Rustgi A.K, et Herman J.G. 2007. Epigenetic silencing of CDX2 is a feature of squamous esophageal cancer. *International Journal of Cancer* 121: 1219-26.

Guo, R.J, Funakoshi S, Lee H.H, Kong J, et Lynch J.P. 2010. The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis* 31: 159-66.

Gutiérrez-González, L, et Wright N.A. 2008. Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. *Digestive and Liver Disease* 40: 510-22.

H

Hammel, P, Huguet F, van Laethem J.L, Goldstein D, Glimelius B, Artru P, Borbath I, et al. 2016. Effect of chemoradiotherapy vs chemotherapy on survival in patients with locally advanced pancreatic cancer controlled after 4 months of gemcitabine with or without erlotinib: the LAP07 randomized clinical trial. *JAMA* 315: 1844-53.

Hashimoto, D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, et al. 2008. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *The Journal of Cell Biology* 181: 1065-72.

Held, T, Verbeke C.S, Strobel O, Rutkowski W, Villard C, Fernández Moro C, Del Chiaro M, Büchler M, Heuchel R, et Löhner M. 2019. Immunohistochemical profiling of liver metastases and matched-pair analysis in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 19: 963-70.

Hick, A.C, van Eyll J.M, Cordi S, Forez C, Passante L, Kohara H, Nagasawa T, et al. 2009. Mechanism of primitive duct formation in the pancreas and submandibular glands: a role for SDF-1. *BMC Developmental Biology* 9: 66.

Hilmi, M, Bartholin L, et Neuzillet C. 2018. Immune therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: where are we now? *World Journal of Gastroenterology* 24: 2137-51.

Hingorani, S.R, Petricoin E.F, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz M.A, Ross S, et al. 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437-50.

Hingorani, S.R, Wang L, Multani A.S, Combs C, Deramaudt T.B, Hruban R.H, Rustgi A.K, Chang S, et Tuveson D.A. 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: 469-83.

Holland, P.W. 2001. Beyond the Hox: how widespread is homeobox gene clustering? *Journal of Anatomy* 199: 13-23.

Hruban, R.H, Canto M.I, Goggins M, Schulick R, et Klein A.P. 2010. Update on familial pancreatic cancer. *Advances in Surgery* 44: 293-311.

Hruban, R.H, et Fukushima N. 2008. Cystic lesions of the pancreas. *Diagnostic histopathology* 14: 260-65.

Hryniuk, A, Grainger S, Savory J.G, et Lohnes D. 2014. Cdx1 and Cdx2 function as tumor suppressors. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 33343-54.

Huo, X, Agoston A.T, Dunbar K.B, Cipher D.J, Zhang X, Yu C, Cheng E, et al. 2017. Hypoxia-inducible factor-2 α plays a role in mediating oesophagitis in GORD. *Gut* 66: 1542-54.

I

INCA. 2015. Les cancers en France/Edition 2014.

INCA. 2019. Conduite à tenir devant des patients atteints d'adénocarcinome du pancréas.

Iodice, S, Gandini S, Maisonneuve P, et Lowenfels A.B. 2008. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393: 535-45.

Ireland, H, Kemp R, Houghton C, Howard L, Clarke A.R, Sansom O.J, et Winton D.J. 2004. Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* 126: 1236-46.

J

Jackson, E.L, Willis N, Mercer K, Bronson R.T, Crowley D, Montoya R, Jacks T, et Tuveson D.A. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-Ras. *Genes & Development* 15: 3243-48.

Jacquemin, P, Yoshitomi H, Kashima Y, Rousseau G.G, Lemaigre F.P, et Zaret K.S. 2006. An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Developmental Biology* 290: 189-99.

Jensen, J.N, Cameron E, Garay M.V, Starkey T.W, Gianani R, et Jensen J. 2005. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128: 728-41.

Jones, S, Hruban R.H, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons D.W, Lin J.C, et al. 2009. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324: 217.

Jonsson, J, Carlsson L, Edlund T, et Edlund H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-9.

K

Kameoka, Y, Kitazawa R, Ariasu K, Tachibana R, Mizuno Y, Haraguchi R, et Kitazawa S. 2015. Reactivation of CDX2 in gastric cancer as mark for gene silencing memory. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 48: 115-24.

Kamisawa, T, Wood L.D, Itoi T, et Takaori K. 2016. Pancreatic cancer. *Lancet* 388: 73-85.

- Kastrinos, F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond V.M, Bandipalliam P, Stoffel E.M, Gruber S.B, et Syngal S. 2009. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 302: 1790-95.
- Katabi, N, et Klimstra D.S. 2008. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical and pathological features and diagnostic approach. *Journal of Clinical Pathology* 61: 1303-13.
- Kawaguchi, Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald R.J, et Wright C.V. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics* 32: 128-34.
- Kawai, H, Tomii K, Toyooka S, Yano M, Murakami M, Tsukuda K, et Shimizu N. 2005. Promoter methylation downregulates CDX2 expression in colorectal carcinomas. *Oncology Reports* 13: 547-51.
- Kesavan, G, Sand F.W, Greiner T.U, Johansson J.K, Kobberup S, Wu X, Brakebusch C, et Semb H. 2009. Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell* 139: 791-801.
- Kim, H. 2008. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut and Liver* 2: 74-80.
- Kim, H.S, Lee J.S, Freund J.N, Min K.W, Lee J.S, Kim W, Juhng S.W, et Park C.S. 2006. CDX-2 homeobox gene expression in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21: 438-42.
- Kim, S, Domon-Dell C, Wang Q, Chung D.H, Di Cristofano A, Pandolfi P.P, Freund J.N, et Evers B.M. 2002. PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-KappaB-dependent pathway. *Gastroenterology* 123: 1163-78.
- Kojima, K, Vickers S.M, Adsay N.V, Jhala N.C, Kim H.G, Schoeb T.R, Grizzle W.E, et Klug C.A. 2007. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Research* 67: 8121-30.
- Kong, J, Crissey M.A, Funakoshi S, Kreindler J.L, et Lynch J.P. 2011. Ectopic Cdx2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus. *PloS One* 6: e18280.
- Kopp, J.L, Dubois C.L, Hao E, Thorel F, Herrera P.L, et Sander M. 2011. Progenitor cell domains in the developing and adult pancreas. *Cell Cycle* 10: 1921-27.
- Kopp, J.L, von Figura G, Mayes E, Liu F.F, Dubois C.L, Morris J.P, Pan F.C, et al. 2012. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22: 737-50.

L

- Lebart, M.C, et Mariani J. 2004. La régulation du cycle cellulaire.
- Leonard, J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, et Montminy M.R. 1993. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Molecular Endocrinology* 7: 1275-83.

Lorentz, O, Cadoret A, Duluc I, Capeau J, Gespach C, Cherqui G, et Freund J.N. 1999. Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic Ras. *Oncogene* 18: 87-92.

Lowenfels, A.B, Maisonneuve P, DiMagno E.P, Elitsur Y, Gates L.K, Perrault J, et Whitcomb D.C. 1997. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 442-46.

M

Marchetti, M, Caliot E, et Pringault E. 2003. Chronic acid exposure leads to activation of the Cdx2 intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocytes. *Journal of Cell Science* 116: 1429-36.

Margalit, Y, Yarus S, Shapira E, Gruenbaum Y, et Fainsod A. 1993. Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene. *Nucleic Acids Research* 21: 4915-22.

Marion-Audibert, A.M, Vullierme M.P, Ronot M, Mabrut J.Y, Sauvanet A, Zins M, Cuilleron M, Sa-Cunha A, Lévy P, et Rode A. 2018. Routine MRI with DWI sequences to detect liver metastases in patients with potentially resectable pancreatic ductal carcinoma and normal liver CT: a prospective multicenter study. *American Journal of Roentgenology* 211: 217-25.

Matsumoto, K, Mizoshita T, Tsukamoto T, Ogasawara N, Hirata A, Shimizu Y, Haneda M, Yamao K, et Tatematsu M. 2004. Cdx2 Expression in pancreatic tumors: relationship with prognosis of invasive ductal carcinomas. *Oncology Reports* 12: 1239-43.

McWilliams, R.R, Petersen G.M, Rabe K.G, Holtegaard L.M, Lynch P.J, Bishop M.D, et Highsmith W.E. 2010. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations and risk for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 116: 203-9.

Miller, C.P, McGehee R.E, et Habener J.F. 1994. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *The EMBO Journal* 13: 1145-56.

Miyatsuka, T, Kosaka Y, Kim H, et German M.S. 2011. Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 185-90.

Mizoshita, T, Tsukamoto T, Nakanishi H, Inada K.I, Ogasawara N, Joh T, Itoh M, Yamamura Y, et Tatematsu M. 2003. Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 129: 727-34.

Mlodzik, M, et Gehring W.J. 1987. Expression of the caudal gene in the germ line of drosophila: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48: 465-78.

Moffitt, R.A, Marayati R, Flate E.L, Volmar K.E, Herrera Loeza S.G, Hoadley K.A, Rashid N.U, et al. 2015. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Genetics* 47: 1168-78.

Moskaluk, C.A, Zhang H, Powell S.M, Cerilli L.A, Hampton G.M, et Frierson H.F. 2003. Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Modern Pathology* 16: 913-19.

Mosnier, J.F. 2012. Digestive metaplasia: biology and physiopathology. *Annales De Pathologie* 32: S67-69.

Mutoh, H, Hakamata Y, Sato K, Eda A, Yanaka I, Honda S, Osawa H, Kaneko Y, et Sugano K. 2002. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 470-79.

Mutoh, H, Hayakawa H, Sakamoto H, et Sugano K. 2007. Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor-KappaB. *Journal of Gastroenterology* 42: 719-29.

N

Neuzillet, C, Gaujoux S, Williet N, Bachet J.B, Baugeuon L, Colson Durand L, Conroy T, et al. 2018. Pancreatic cancer : french clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Digestive and Liver Disease* 50: 1257-71.

Niu, H, Jia Y, Li T, et Su B. 2017. SOX2 inhibition promotes promoter demethylation of CDX2 to facilitate gastric intestinal metaplasia. *Digestive Diseases and Sciences* 62: 124-32.

O

Oettle, H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann J.T, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, et al. 2013. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 310: 1473-81.

Oettle, H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, et al. 2007. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297: 267-77.

Offield, M.F, Jetton T.L, Labosky P.A, Ray M, Stein R.W, Magnuson M.A, Hogan B.L, et Wright C.V. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-95.

Oliver-Krasinski, J.M, et Stoffers D.A. 2008. On the origin of the beta cell. *Genes & Development* 22: 1998-2021.

O'Riordan, J.M, Abdel-latif M.M, Ravi N, McNamara D, Byrne P.J, McDonald G.S.A, Keeling P.W.N, Kelleher D, et Reynolds J.V. 2005. Proinflammatory cytokine and nuclear factor Kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *The American Journal of Gastroenterology* 100: 1257-64.

P

Pan, F.C, et Wright C. 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics* 240: 530-65.

Pandol, S.J, Saluja A.K, Imrie C.W, et Banks P.A. 2007. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 132: 1127-51.

Park, D.Y, Srivastava A, Kim G.H, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Zukerberg L.R, Song G.A, et Lauwers G.Y. 2010. CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance. *Modern Pathology* 23: 54-61.

Park, H.S, Lee J.M, Choi H.K, Hong S.H, Han J.K, et Choi B.I. 2009. Preoperative evaluation of pancreatic cancer: comparison of Gadolinium-enhanced dynamic MRI with MR cholangiopancreatography versus MDCT. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 30: 586-95.

Poll, A.V, Pierreux C.E, Lokmane L, Haumaitre C, Achouri Y, Jacquemin P, Rousseau G.G, Cereghini S, et Lemaigre F.P. 2006. A VHN1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes* 55: 61-69.

Puleo, F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, Quertinmont E, et al. 2018. Stratification of pancreatic ductal adenocarcinomas based on tumor and microenvironment features. *Gastroenterology* 155: 1999-2013.

R

Rahib, L, Smith B.D, Aizenberg R, Rosenzweig A.B, Fleshman J.M, et Matrisian L.M. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research* 74: 2913-21.

Raimondi, S, Lowenfels A.B, Morselli-Labate A.M, Maisonneuve P, et Pezzilli R. 2010. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 24: 349-58.

Ramalho-Santos, M, Melton D.A, et McMahon A.P. 2000. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127: 2763-72.

Rawat, V.P.S, Cusan M, Deshpande A, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Humphries R.K, Bohlander S.K, Feuring-Buske M, et Buske C. 2004. Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(P13;Q12) acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 817-22.

Renouf, B, Soret C, Saandi T, Delalande F, Martin E, Vanier M, Duluc I, Gross I, Freund J.N, et Domon-Dell C. 2012. Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Research* 40: 3456-69.

Rings, E.H, Boudreau F, Taylor J.K, Moffett J, Suh E.R, et Traber P.G. 2001. Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 121: 1437-50.

Roberts, N.J, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen G.M, Bondy M.L, Gallinger S, et al. 2012. ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discovery* 2: 41-46.

Ruijs, M.W.G, Verhoef S, Rookus M.A, Pruntel R, van der Hout A.H, Hogervorst F.B.L, Kluijdt I, et al. 2010. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *Journal of Medical Genetics* 47: 421-28.

Rustgi, A.K. 2014. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes & Development* 28: 1-7.

- Saad, R.S, Ghorab Z, Khalifa M.A, et Xu M. 2011. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: its utility and limitations. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 3: 159-66.
- Sakamoto, N, Feng Y, Stolfi C, Kurosu Y, Green M, Lin J, Green M.E, et al. 2017. BRAFV600E cooperates with CDX2 inactivation to promote serrated colorectal tumorigenesis. *eLife* 6:e20331.
- Scholl, C, Bansal D, Döhner K, Eiwen K, Huntly B.J.P, Lee B.H, Rücker F.G, et al. 2007. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 1037-48.
- Seymour, P.A, Freude K.K, Tran M.N, Mayes E.E, Jensen J, Kist R, Scherer G, et Sander M. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1865-70.
- Seymour, P.A, Shih H.P, Patel N.A, Freude K.K, Xie R, Lim C.J, et Sander M. 2012. A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* 139: 3363-72.
- Shih, H.P, Kopp J.L, Sandhu M, Dubois C.L, Seymour P.A, Grapin-Botton A, et Sander M. 2012. A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Development* 139: 2488-99.
- Shih, H.P, Wang A, et Sander M. 2013. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29: 81-105.
- Silberg, D.G, Swain G.P, Suh E.R, et Traber P.G. 2000. Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 119: 961-71.
- Siveke, J.T, Einwächter H, Sipos B, Lubeseder-Martellato C, Klöppel G, et Schmid R.M. 2007. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12: 266-79.
- Solar, M, Cardalda C, Houbracken I, Martín M, Maestro M.A, De Medts N, Xu X, et al. 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Developmental Cell* 17: 849-60.
- Soret, C, Martin E, Duluc I, Dantzer F, Vanier M, Gross I, Freund J.N, et Domon-Dell C. 2016. Distinct mechanisms for opposite functions of homeoproteins Cdx2 and HoxB7 in double-strand break DNA repair in colon cancer cells. *Cancer Letters* 374: 208-15.
- Stringer, E.J, Duluc I, Saandi T, Davidson I, Bialecka M, Sato T, Barker N, et al. 2012. Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development* 139: 465-74.
- Subtil, C, Guérin E, Schneider A, Chenard M.P, Martin E, Domon-Dell C, Duluc I, et al. 2007. Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Letters* 247: 197-203.

T

Tempero, M.A, Malafa M.P, Behrman S.W, Benson A.B, Casper E.S, Chiorean E.G, Chung V, et al. 2014. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 12: 1083-93.

Thésaurus national de Cancérologie Digestive. 2018. Chapitre 9 - Cancer du pancréas.

Thoene, S, Rawat V.P.S, Heilmeier B, Hoster E, Metzeler K.H, Herold T, Hiddemann W, et al. 2009. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23: 649-55.

Thompson, N, Gésina E, Scheinert P, Bucher P, et Grapin-Botton A. 2012. RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors. *Molecular and Cellular Biology* 32: 1189-99.

V

Vang, R, Gown A.M, Wu L.S.F, Barry T.S, Wheeler D.T, Yemelyanova A, Seidman J.D, et Ronnett B.M. 2006. Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7. *Modern Pathology* 19: 1421-28.

Vasen, H.F, Gruis N.A, Frants R.R, van Der Velden P.A, Hille E.T, et Bergman W. 2000. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of P16 (P16-Leiden). *International Journal of Cancer* 87: 809-11.

Versteijne, E, Suker M, Groothuis K, Akkermans-Vogelaar J.M, Besselink M.G, Bonsing B.A, Buijsen J, et al. 2020. Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: results of the Dutch randomized phase III PREOPANC trial. *Journal of Clinical Oncology* 38: 1763-1773.

Verzi, M.P, Shin H, He H.H, Sulahian R, Meyer C.A, Montgomery R.K, Fleet J.C, Brown M, X. Liu X.S, et Shivdasani R.A. 2010. Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Developmental Cell* 19: 713-26.

Verzi, M.P, Shin H, Ho L.L, Liu X.S, et Shivdasani R.A. 2011. Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Molecular and Cellular Biology* 31: 2026-39.

Villasenor, A, Chong D.C, Henkemeyer M, et Cleaver O. 2010. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* 137: 4295-4305.

Von Hoff, D.D, Ervin T, Arena F.P, Chiorean E.G, Infante J, Moore M, Seay T, et al. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with Nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine* 369: 1691-1703.

Vu, T, Straube J, Porter A.H, Bywater M, Song A, Ling V, Cooper L, et al. 2020. Hematopoietic stem and progenitor cell-restricted Cdx2 expression induces transformation to myelodysplasia and acute leukemia. *Nature Communications* 11: 3021.

W

Waddell, N, Pajic M, Patch A.M, Chang D.K, Kassahn K.S, Bailey P, Johns A.L, et al. 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518: 495-501.

Wang, X.T, Wei W.Y, Kong F.B, Lian C, Luo W, Xiao Q, et Xie Y.B. 2012. Prognostic significance of Cdx2 immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis of published literatures. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31: 98.

Wei, D, Wang L, Yan Y, Jia Z, Gagea M, Li Z, Zuo X, Kong X, Huang S, et Xie K. 2016. KLF4 is essential for induction of cellular identity change and acinar-to-ductal reprogramming during early pancreatic carcinogenesis. *Cancer Cell* 29: 324-38.

Werling, R.W, Yaziji H, Bacchi C.E, et Gown A.M. 2003. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 27: 303-10.

Whitcomb, D.C, et Lowe M.E. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences* 52: 1-17.

Witek, M.E, Snook A.E, Lin J.E, Blomain E.S, Xiang B, Magee M.S, Magee M, et Waldman S.A. 2014. A novel CDX2 isoform regulates alternative splicing. *PloS One* 9: e104293.

Wood, L.D, et Hruban R.H. 2012. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer Journal* 18: 492-501.

X

Xiao, W, Hong H, Awadallah A, Zhou L, et Xin W. 2014. Utilization of CDX2 expression in diagnosing pancreatic ductal adenocarcinoma and predicting prognosis. *PloS One* 9: e86853.

Xin, S, Huixin C, Benchang S, Aiping B, Jinhui W, Xiaoyan L, Yu W.B.C, et Minhu C. 2007. Expression of Cdx2 and Claudin-2 in the multistage tissue of gastric carcinogenesis. *Oncology* 73: 357-65.

Y

Ying, H, Dey P, Yao W, Kimmelman A.C, Draetta G.F, Maitra A, et DePinho R.A. 2016. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 30: 355-85.

Yuan, J, Yin Z, Tao K, Wang G, et Gao J. 2017. Homeobox protein CDX2 as a prognostic biomarker in solid malignancies: a meta-analysis. *Oncotarget* 8: 89160-72.

Yuasa, Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Sakai H, Nakajima T, Ohkura Y, Takizawa T, et al. 2005. Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis* 26: 193-200.

Z

Zhou, Q, Law A.C, Rajagopal J, Anderson W.J, Gray P.A, et Melton D.A. 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Developmental Cell* 13: 103-14.

Zins, M, Petit E, Boulay-Coletta I, Balaton A, Marty O, et Berrod J.L. 2005. Imaging of pancreatic adenocarcinoma. *Journal De Radiologie* 86: 759-79.

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

1. Publication

Caron B, Averous G, Nair A, Vanier M, Jonckheere N, Martin E, Plateroti M, Rebours V, Cros J, Bachellier P, Tavian M, Reimund JM, Freund JN, Duluc I. **Precancerous lesions induced by the CDX2 homeoprotein in the pancreas reveal separate functions of the DNA-binding and transactivation domains.** *En préparation*

2. Communications orales

Caron B, Nair A, Averous G, Martin E, Freund JN, Reimund JM, Duluc I. **Métaplasies acino-canaliaires induites par le gène homéotique CDX2 dans le pancréas.** Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Paris, 2020.

Caron B, Nair A, Averous G, Martin E, Freund JN, Reimund JM, Duluc I. **Importance de l'expression du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers du pancréas.** 19^{ème} journée scientifique de la Ligue contre le Cancer, Strasbourg, 2018.

Caron B, Nair A, Averous G, Martin E, Freund JN, Reimund JM, Duluc I. **Importance de l'expression du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers du pancréas.** 6^{èmes} journées scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, 2018.

3. Communications par affiches

Caron B, Nair A, Averous G, Martin E, Freund JN, Reimund JM, Duluc I. **Physiopathologie du gène homéotique CDX2 dans le pancréas.** Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Paris, 2019.

Caron B, Nair A, Averous G, Martin E, Freund JN, Reimund JM, Duluc I. **Physiopathologie du gène homéotique CDX2 dans le pancréas.** Cancéropôle Grand Est, Reims, 2018.

Caron B, Nair A, Averous G, Nguimpi-Tambou M, Duluc I, Addeo P, Bachellier P, Duclos B, Freund JN, Reimund JM. **CDX2 is a biomarker of better prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma.** Digestive Disease Week, Chicago, 2017.

Caron B, Nair A, Averous G, Nguimpi-Tambou M, Duluc I, Addeo P, Bachellier P, Duclos B, Freund JN, Reimund JM. **L'expression de CDX2, un marqueur pronostique de l'adénocarcinome du pancréas ?** Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, Paris, 2017.

Physiopathologie du gène homéotique CDX2 dans le pancréas

Résumé :

Le facteur de transcription homéotique CDX2 est spécifiquement exprimé dans l'intestin dont il maintient l'identité et contrôle l'homéostasie. Il existe cependant une expression ectopique de CDX2 dans des lésions précancéreuses et des adénocarcinomes du pancréas chez l'homme, mais son rôle reste controversé.

Ce travail de thèse visait à étudier le rôle de CDX2 dans la physiopathologie pancréatique et particulièrement dans la cancérogenèse pancréatique. A partir de l'étude d'une cohorte de patients opérés d'un adénocarcinome pancréatique, nos résultats montrent que l'expression de CDX2 dans la tumeur est associée à de meilleures survie sans récurrence et survie globale. Parallèlement, à l'aide d'un modèle murin transgénique permettant l'expression ectopique de CDX2 dans le pancréas, nos résultats montrent le développement d'une métaplasie acino-canalaire associée à une transdifférenciation intestinale partielle. Dans un contexte génétique de prédisposition au cancer ($Apc^{+/\Delta 14}$ ou KRas), aucune évolution néoplasique n'a pu être observée.

Globalement, ces résultats montrent l'implication complexe de CDX2 dans la cancérogenèse pancréatique.

Mots clés : CDX2, adénocarcinome pancréatique, métaplasie acino-canalaire

Abstract:

The intestine-specific transcription factor CDX2 is required throughout life for intestinal homeostasis and for the maintenance of intestinal identity. In pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic precancerous lesions, CDX2 expression was described, but results concerning its significance are conflicting.

This work aimed to investigate the pathophysiological consequences of the expression of CDX2 in pancreas. Our results show that CDX2 expression in pancreatic adenocarcinoma is associated to a better recurrence-free survival and a better overall survival. The study of the functional consequences of the ectopic expression of CDX2 in the pancreas, using a murine model, shows the development of acinar-to-ductal metaplasia accompanied by incomplete intestinal metaplasia. In a genetic context predisposing to the pancreatic cancer ($Apc^{+/\Delta 14}$ ou KRas), these lesions don't evolve into pancreatic adenocarcinoma.

Collectively, these results suggest the complex role of CDX2 in pancreatic carcinogenesis.

Key words: CDX2, pancreatic adenocarcinoma, acinar-to-ductal metaplasia